

**Terápiás potenciállal rendelkező növényi szimbiotikus
peptidek patogén gombákra gyakorolt hatásának és
toxicitásának vizsgálata**

Ph.D. értekezés

Fábri-Ördögh Lilla

Témavezető: Dr. Kereszt Attila

Biológia Doktori Iskola

MTA SZBK Biokémia Intézet

SZTE TTIK

Szeged

2014.

TARTALOMJEGYZÉK

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
1.1 Gombák okozta betegségek és azok kezelésére alkalmazott szerek	3
1.2 Antimikrobiális szerekkel szemben kialakuló rezisztenciák	8
1.3 Antimikrobiális peptidek	10
1.4 Antimikrobiális peptidekkel szemben kialakuló rezisztenciák	15
1.5 Antimikrobiális peptid szerű molekulák szimbiózisban betöltött szerepe	16
1.6 Gümöspecifikus ciszteinben gazdag peptidek eddig megismert antimikrobiális tulajdonságai	23
2. CÉLKITŰZÉSEK	26
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	27
3.1 A vizsgálatokban szereplő mikroorganizmusok	27
3.2 Alkalmazott táptalajok, tápoldatok, tenyésztési körülmények	28
3.3 A vizsgálatokban szereplő humán sejtvonal.....	28
3.4 Alkalmazott peptidek	29
3.5 Antifungális érzékenység vizsgálat.....	29
3.6 Peptidek szérum érzékenységének vizsgálata	30
3.7 Fluoreszcens és konfokális mikroszkópia	31
3.8 Sejtpermeabilitás vizsgálat.....	31
3.9 Affinitás kromatográfiai vizsgálatok <i>C. albicans</i> fehérje preparátumokon ..	32
3.10 Feltételezett kölcsönható partnerek vizsgálata élesztő kettős-hibrid módszerrel	33
3.11 RNS tisztítás <i>C. albicans</i> sejtekből.....	35
3.12 Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)	35
3.13 Citotoxicitási vizsgálatok.....	36
3.14 NCR peptidek hatásának vizsgálata vaginális epitél sejt- <i>C. albicans</i> kevert kultúrán	37
4. EREDMÉNYEK.....	39

4.1. NCR peptidek antifungális hatása élesztőszerűen növvő és fonalas gombákkal szemben.....	39
4.2 NCR peptidek <i>C. albicans</i> -ra gyakorolt hatása.....	42
4.2.1 NCR-ek <i>C.albicans</i> -szal szembeni minimális gátló koncentrációinak és minimális fungicid koncentrációinak meghatározása	42
4.2.2 NCR peptidek <i>Candida</i> sejtmembrán permeabilizáló hatása	45
4.2.3 NCR peptidek lokalizációja <i>C.albicans</i> -ban.....	46
4.2.4 Az NCR peptidekkel kölcsönható <i>Candida</i> fehérjék azonosítása	47
4.3 NCR-ek citotoxicitásának vizsgálata humán epitél sejteken	52
4.4 A kationos NCR peptidek megakadályozzák a humán vaginális epitél sejtek <i>C.albicans</i> okozta elhalását <i>in vitro</i>	54
5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	57
6. KÖVETKEZTETÉSEK	61
7. ÖSSZEFOGLALÓ	62
8. SUMMARY.....	65
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	67
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	76

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1 Gombák okozta betegségek és azok kezelésére alkalmazott szerek

A gombák az eukarióta mikroorganizmusoknak egy rendkívül heterogén csoportját alkotják, melyek minden elképzelhető ökológiai niche-ben elterjedtek. Nagy a fajgazdagság a szaprofiták, vagyis korhadéklakók körében, ezek főként szerves hulladékokban élnek. De gombák nőhetnek akár más gombán is. Előfordulhatnak vizes környezetben és talajban egyaránt, és spóráikkal beszennyezhetik a levegőt is. Vannak gombák, különösen az élesztők között, melyek fermentációs folyamatokban játszanak fontos szerepet. Másokat enzimek, citromsav és más szerves anyag termeléséhez használnak fel (Esser, Lemke mtsai. 2001). Egyes gombák ehetőek, míg mások mérgezőek. Ezen végletek között számos gomba létezik, melyek képesek fertőzéseket létrehozni akár a tüdőben, a bőrön, vagy a körmön. A gombás fertőzéseket okozó patogén formáik az élet minden területét érintik az egész világon. A kórházi vagy egészségügyi intézményekben szerzett, úgynevezett nozokomiális fertőzések, vagy más gomba okozta betegségek nem csak az emberi lakosságot fenyegetik, hanem az állatokat és növényeket is.

A közel 100.000 ismert gombafajnak mintegy 10%-a képes növényeket kolonizálni, és ennek egy kisebbik hányada betegségeket is okoz a gazdanövényen. Mintegy 300.000 virágos növényt támadnak meg patogén gombák, ami éves szinten komoly terménykiesést jelent és ez súlyos gazdasági probléma (Knogge 1996). A növény-gomba kapcsolat azonban előnyös is lehet akár mindkét fél számára. Erre példa a mikorrhiza jelensége, ami egy olyan mutualista szimbiotikus kapcsolat, ami már mintegy 400 millió éve morfológiailag változatlan (Parniske 2008).

A gombás fertőzéseket más néven mikózisnak nevezzük. Habár a legtöbb gomba ártalmatlan az emberre nézve, némelyek képesek speciális körülmények között betegségeket okozni. A gombák egy része spórával szaporodik, melyeket szervezetünk direkt kontaktus útján, vagy belélegezve vehet fel. Ezért van az, hogy a gombás fertőzések gyakran a tüdőt, a bőrt vagy a körmöket érintik. A gomba át is hatolhat a bőrön és ezzel az egész testet érintő szisztémás fertőzést tud kialakítani, megfertőzve más szerveket is.

A gombás fertőzések kórokozói nem csak obligát patogének lehetnek, hanem úgynevezett opportunistáknak is, melyek, mint például a *Candida albicans*, vagy a *Malassezia furfur*, a normál humán mikroflóra tagjai, azonban immunszuppresszált vagy

immundeficiens (mint például neutropéniában szenvedő, szervtranszplantált, kemoterápia alatt álló, AIDS-es) egyéneknél súlyos betegségeket okozhatnak. Az aszpergillózis és a kandidiázis a legelterjedtebb invazív mikózisok. Az egyre jobban terjedőben levő zigomikózissal együtt, ezek a fertőzések nagy gyakorisággal fenyegetik a legyengült immunrendszerű betegeket, és sajnos néha végzetes kimenetelűek is lehetnek (Chayakulkeeree, Ghannoum mtsai. 2006).

Az aszpergillózis fertőzések 90%-át az *Aspergillus fumigatus* okozza. E mellett az *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* és az *Aspergillus nidulans* is egyre gyakoribb fertőző ágens (Marr, Patterson mtsai. 2002). A penészgombák okozta invazív fertőzések közül az aszpergillózis az utóbbi 10-15 évben került túlsúlyba. Ennek hátterében az erősen veszélyeztetett betegek, úgymint a szervtranszplantáltak, a csontvelő átültetésen (vérképző őssejt-transzplantáción) átesettek, HIV fertőzöttek, vagy valamilyen intenzív kemoterápiában részesülők számának folyamatos növekedése áll (Mahfouz és Anaissie 2003). Igen magas a halálozási arány az aszpergillózissal felülfertőződött betegeknél (például HIV fertőzötteknél 86%). Az *Aspergillus*-ok mindenütt előfordulnak környezetünkben. Megfertőzhetik a belső szerveket, így a tüdőt, vagy ritkább esetben a központi idegrendszert, a szívet, csontokat, valamint külső aszpergillózisok alakulhatnak ki égési sebekben, vagy a szem és fül traumáinak felülfertőzéseként (Gergely 2003).

Az invazív gombafertőzések világszerte legelterjedtebb okozói a *Candida* fajok. Egy populáció szintű felmérés alapján évente 72,8 millió eset köthető candida fertőzéshez (Pfaller és Diekema 2007). Az Egyesült Államokban ez a negyedik leggyakoribb a véráramot érintő nozokomiális fertőzést okozó gombák közül. A *C. albicans* mellett, amely már régóta a legismertebb invazív kandidiázist kiváltó faj, az elmúlt 10-15 évben folyamatosan nőtt az egyéb *Candida* fajok, mint a *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* és a *Candida krusei* által okozott kandidiázisok gyakorisága is. A *C. albicans* az egészséges humán populáció mintegy 30-70%-ánál a bőr, genitális és bél nyálkahártya normál flórájának tagja (Gow, van de Veerdonk mtsai. 2012). Megfelelő immunválasz hiányában, ha a szervezet nem tudja kontrollálni a nyálkahártya gomba általi kolonizációját/kolonizálódását, vagy ha a kompetitív kommenzalista baktériumok összetételében zavar keletkezik, a gomba túlnövekedése betegségekhez és súlyosabb esetekben elhalálozáshoz vezet. A *Candida*-ra jellemző az úgynevezett dimorfizmus, vagyis kétalakúság, ami mind *in vitro*, mind pedig a gazdaszervezeten belül, *in vivo* is megfigyelhető. A fenotípusváltás képességét a sarjadzó élesztősejt és a fonalasan

növő forma közt fontos virulencia faktornak tartják (Kumamoto és Vincses 2005). A hifák ugyanis képesek mechanikai erőt kifejteni elősegítve ezzel az epitél felszínek penetrációját, valamint károsítják az endotél sejteket, ezáltal a *Candida* a véráramból mélyebb szöveti rétegekbe is eljut. Az erősen specializált patogénekkel szemben, melyek egy fő virulencia faktorról rendelkeznek (mint például a *Clostridium tetani*), a *C. albicans* egy sor folyamatot aktivál, ami hozzájárul virulenciájához. A gazdaszervezeten belül van néhány niche, ahol meghatározott gomba fehérjéknek (mint például adhezineknek, proteázoknak) van szerepe a fertőzés kialakításában, míg más életterekben belül ezek a fehérjék kevésbé jelentősek, és más faktoroknak jut domináns szerep. (Baixench, Aoun mtsai. 2007)

A *Zygomycetes* osztály tagjai elsősorban kozmopolita talajlakó; raktári kártevő; állat, illetve humánpatogén és mikorrhizaalkotó fajok. Az opportunisták állat és humánpatogén fajok (például *Absidia*, *Mortierella*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Saksenaea*) által kiváltott fertőzéseket zigomikózis néven foglaljuk össze. A humán betegségeket leggyakrabban a *Mucorales* rend tagjai okozzák. Ezen fertőzések jellemző kórképe a gyorsan kialakuló és elterjedő szöveti roncsolódás, és az erek inváziója (Gonzalez, Rinaldi mtsai. 2002), (Chayakulkeeree, Ghannoum mtsai. 2006). A leggyakoribb megjelenési formái a rhinocerebrális, a pulmonáris, a gasztrointesztinális, az elsődleges bőr és a disszeminált zigomikózisok. Ezek esetszáma az utóbbi években fokozatosan emelkedik az immunszuppresszált betegek növekvő száma következtében. Hajlamosító tényező lehet az elhanyagolt diabetes mellitus (Chayakulkeeree, Ghannoum mtsai. 2006), a rosszindulatú hematológiai megbetegedések, a szerv- és csontvelőátültetés, a szteroidok használata, a metabolikus acidózis, a deferoxamin terápia (Cornely 2008) és a súlyos, hosszan tartó neutropénia (Ribes, Vanover-Sams mtsai. 2000). A zigomikózis fertőzések 30-50%-a rhinocerebrális mikózis, melynek során, a sporangiospórák a levegővétellel bejutnak a felsőbb légutakba, majd néhány nap elteltével a fejlődő hifák az orrüregből betérjednek az agyba. Az esetek több mint 80%-ánál a fertőzés halálos végkimenetelű (Hsiao, Tsan mtsai. 2002), (Ribes, Vanover-Sams mtsai. 2000). Diabéteszes betegek elsősorban a rhinocerebrális formájára hajlamosak a zigomikózisoknak, míg a pulmonáris megbetegedés az immunszuppresszáltak körében gyakoribb (Roden, Zaoutis mtsai. 2005).

A *Fusarium* fajok jelentős növényi kártevők, melyek számos betegséget okoznak, úgymint csúcsrothadást, gabonafélék üszkösödését és varasodását (Nelson, Dignani mtsai. 1994), de alkalmanként okozhatnak állati fertőzéseket is (Evans, Levesque mtsai. 2004). A gabonanövények fuzariózisa a termés hozam csökkentésével mennyiségi, a gabonaszemek

mikotoxinokkal történő szennyezésével pedig minőségi károkat is okoz. A *Fusarium*ok a humán szervezetben is számos fertőzést idéznek elő (Nucci és Anaissie 2007). Ezek lehetnek felületi fertőzések (ilyenek például a keratitis és az onychomycosis), vagy invazív fertőzések. Ez utóbbi csaknem kizárólag a súlyos immunhiányban szenvedő betegeket érinti (Nucci és Anaissie 2002). Okozhatnak allergiás megbetegedéseket is (sinusitis) megfelelő immunrendszerrel rendelkező egyéneknél (Wickern 1993) és mikotoxikózist *Fusarium* által termelt toxinnal szennyezett élelmiszer elfogyasztását követően mind emberben, mind pedig állatban (Nelson, Dignani mtsai. 1994).

A *Malassezia* nemzetségbe tartozó lipofil élesztők, ahogy korábban már említésre került, a bőr normál mikroflórájának tagjai emberben és több melegvérű állatban egyaránt, azonban kapcsolatba hozhatóak számos betegséggel is. 1846-ban Eichstedt volt az első, aki felismerte az összefüggést a *Malassezia* élesztő és a napgomba néven ismertebb dermatomikózis, a pityriasis versicolor, vagy más néven tinea versicolor között. A *Candidához* hasonlóan a *Malassezia* is képes hifát növeszteni, ez azonban nem minden fajra igaz és csak alkalmanként megfigyelhető (Gueho, Midgley mtsai. 1996). Minthogy ezek a gombák obligát lipid-függők, a *M. pachydermatis* kivételével minden *Malassezia* faj igényel egy külső lipid forrást növekedéséhez. Mindazonáltal ezeket a lipideket fontos virulencia faktornak is tartják, mivel úgy tűnik, hogy a lipid réteg megvédi a gombát a fagocitózistól és gátolja az inflammatórikus immunválaszokat (Kesavan, Holland mtsai. 2000). Ezen kívül a lipid-gazdag sejtfal hidrofobicitásának közvetítő szerepe lehet a gomba gazdasejthez történő adhéziójában.

A *Malassezia* által kiváltott felszíni, vagy szuperficiális mikózisok csoportján túl a dermatomikózisok (a bőr és bőrfüggelékek gombás megbetegedései) leggyakoribb csoportját a dermatophytonok által okozott dermatofitózisok alkotják. Ezek a leggyakoribb és legszélesebb körben elterjedt népbetegségek között szerepelnek (Odom 1993). A legtöbb esetben a dermatofitózisok a bőrt, a körmöket, a haját és a szőrzetet támadják (Ogawa, Summerbell mtsai. 1997). A dermatophytonok patogenezisét keratinofília jellemzi, vagyis a szaruképletekben növekednek és szaporodnak. Csoportjukat három genus alkotja, melyek morfológiai jellegeik alapján könnyen elkülöníthetők egymástól, ezek a *Trichophyton*, *Microsporum* és az *Epidermophyton* nemzetségek (Weitzman és Summerbell 1995). Az ide tartozó fajok csak a felszínes, keratinban dús szöveteket támadják meg, a mélyebb szövetekbe csak immunszuppresszió esetén hatolnak be (Gergely

2003). A szisztémás gombafertőzésekkel ellentétben a bőrgombásodások többnyire csak kozmetikai problémát okoznak, de az életet nem fenyegetik.

Ezen fertőzések kezelésére szolgáló lehetőségek között szerepel az amfotericin B és annak lipid készítményei, ám az ezzel a szerrel kapcsolatos toxicitási gondok limitálják felhasználhatóságukat. A flukonazol hatékony ugyan a kandidiázis megelőzésében és kezelésében, de a penészgombákkal, így az *Aspergillus* és *Fusarium* fajokkal valamint a *Zygomycetes*-ekkel szembeni inaktivitása és az ellene kialakuló egyre gyakoribb rezisztencia miatt szintén limitáltak az alkalmazhatósági lehetőségek. Az újabb azol készítményeknek, különösen a vorikonazolnak és a poszakonazolnak már kiterjedtebb a hatásspektruma, így aktívak *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Fusarium* fajokkal szemben egyaránt, és a poszakonazol a *Zygomycetes*-ekkel szemben is. Az echinokandinok jó hatékonysággal vethetők be *Candida* vagy *Aspergillus* fertőzések ellen, de a többi, fentebb említett gombával szemben hatástalanok (Cornely 2008).

Az antifungális szerek választéka az utóbbi években bővült ki. Az alap készítmények mellett, mint amilyen az amfotericin B és az első generációs azolok (pl. flukonazol) voltak, a kiterjedt spektrumú azolok és az echinokandinok csak mostanában kerültek be a terápiás gyakorlatba. Az amfotericin B egy polién típusú antibiotikum, ami már 40 éve oszlopos tagja az antifungális terápiáknak (Ellis 2002). Elsőként *Streptomyces nodosus*-ból izolálták, nevét amfipatikus jellege után kapta, mivel savas és bázikus jellegű molekulákhoz egyaránt kapcsolódik. Az ergoszterolhoz kötve pórusokat képez a sejtmembránon, amin keresztül K^+ jut ki a sejtől, ami végül a sejt pusztulásához vezet. Bár ez jelenleg a leghatásosabb antifungális készítmény, a nagy dózisú alkalmazásával járó súlyos mellékhatások, mint vesekárosodás, vagy hipokalémia (K^+ hiány), erősen limitálják használatát (Deray 2002). Lipid készítményei, mint a liposzómás amfotericin B (L-AMB), koloiddiszperziós amfotericin B (ABCD), vagy az amfotericin B lipid komplex (ABLC), kevésbé tűnnek nefrotoxikusnak, mint az eredeti forma (Wingard, White mtsai. 2000).

Az azolok a gombasejtfal fő szterol komponensének, az ergoszterol szintézisének (a bioszintézisében szerepet játszó lanoszterol-demetiláz enzim) gátlásával fejtik ki antifungális aktivitásukat (Boucher, Groll mtsai. 2004). A flukonazol megjelenése nagy előrelépés volt a szisztémás gombás fertőzések terápiájában (Gallagher és Lee 2004). Azonban az egyre gyakoribbá váló flukonazol használatával összefüggésbe hozható olyan rezisztens *Candida* törzsek felbukkanása, melyek eddig érzékenyek bizonyultak a szerrel szemben. A széles spektrumú azolok közül, az itrakonazol jó *in vitro* hatékonysággal lép

fel az élesztők (*Candida* és *Cryptococcus* fajok), dermatofiták és néhány penészfaj ellen (Sabatelli, Patel mtsai. 2006). Azonban a *Candida* fajok közül nagyfokú itrakonazol rezisztenciát mutat a *C. krusei* és a *C. glabrata*, melyekkel szemben a flukonazol is limitált aktivitással bír (Pappas, Rex mtsai. 2004). Mi több, keresztrezisztenciát is megfigyeltek már e két szer között (Chryssanthou és Sjolín 2004). A vorikonazol hatékony az amfotericin B rezisztens *A. terreus*-szal és a fentebb említett két *Candida* fajjal szemben is (Sabatelli, Patel mtsai. 2006). Keresztrezisztenciát ennél a szernél is tapasztaltak a flukonazollal, és használatát tovább limitálja, hogy intravénás alkalmazhatóságához szükség van ciklodextrin együttes adására, mely veseelégtelenségben szenvedő betegeknél nefrotoxikus hatású lehet (Chryssanthou és Sjolín 2004), (Neofytos, Lombardi mtsai. 2012). A posztrakonazol aktív a leggyakrabban izolált patogén élesztő és penészfajokkal szemben, beleértve azokat a *Candida* és *Aspergillus* fajokat, melyek amfotericin B-re és a többi azolra rezisztensnek bizonyultak (Sabatelli, Patel mtsai. 2006). Elsődleges limitáló tényezője a posztrakonazol terápiának, hogy csak orális szuszpenzióban áll rendelkezésre.

Az echinokandinok nagy lipopeptid molekulák, melyek a gombasejtfalat alkotó 1,3- β -D-glükán szintézisét gátolják (Denning 2003). Minden echinokandin csak intravénásan adható. Az eltérő hatásmechanizmusaik miatt az egyes echinokandinok és más antifungális szerek között nem várt a keresztrezisztencia kialakulása. A caspofungin számos terápiában, mint például orofaringeális és özofagális kandidiázis kezelésében, vagy invazív kandidiázis esetén hasonló hatékonysággal vethető be, mint az amfotericin B vagy a flukonazol (Villanueva, Gotuzzo mtsai. 2002), (Mora-Duarte, Betts mtsai. 2002). Invazív aszpergillózis esetén amfotericin B-vel együtt alkalmazva pedig még jobb eredmény érhető el (Maertens, Raad mtsai. 2004). Az anidulafungin és a micafungin jól alkalmazható candidémia, és a caspofunginhoz hasonlóan invazív kandidiázis kezelésére is (Cornely 2008). A többi antifungális készítményhez képest ezek előnye, hogy kevesebb káros hatással jár alkalmazásuk.

1.2 Antimikrobiális szerekkel szemben kialakuló rezisztenciák

Antimikrobiális szereket már mintegy 80 éve használunk fertőzések kezelésére. Az 1940-es évek óta ezek a szerek jelentősen lecsökkentették a fertőzések által okozott megbetegedések és elhalálozások számát. Azonban a napjainkban használatos antibiotikumok hosszantartó és széles körben történő alkalmazásával megjelentek az úgynevezett multidrog rezisztens (MDR) mikroorganizmusok, melyek adaptálódtak az

ellenük kifejlesztett antibiotikumokhoz, lecsökkentve ezáltal azok hatékonyságát. A Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokon túl számos gomba, vírus és parazita alakított ki rezisztenciát. Egyesek egyetlen antimikrobiális szerrel (vagy azok egy csoportjával) szemben váltak rezisztenssé, míg mások több szerrel szemben is. Ez utóbbiak tartoznak az MDR organizmusok közé. Az MDR mikrobákkal szembeni védekezés egyre nehezebb, és időben egyre elnyúltabb terápiákat igényel. Egyes esetekben a rezisztencia oly mértékűvé vált, hogy nem áll rendelkezésre hatékony antibiotikum. Ezen organizmusok fokozottan növekvő száma komoly gondot okoz az egészségügynek, különösen, ha figyelembe vesszük, hogy az új antimikrobiális szerek száma, amelyek fejlesztés alatt állnak, igen limitált (Boucher, Talbot mtsai. 2009).

Az antibiotikumoknak a nem kizárólag humán egészségügyben történő alkalmazása szintén hozzájárul a rezisztencia terjedéséhez (Martinez és Baquero 2002). Köztudott, hogy az antimikrobiális szereknek az állati takarmányozásban történő alkalmazásához bakteriális rezisztencia kialakulása köthető. Például, *Salmonella* és *Campylobacter* fajok rezisztenssé válnak egyes antibiotikumokra és az antibiotikum rezisztencia génjeiket átjuttatják a természetes humán flóra tagjaiba, például *Enterococcus* fajokba. Vagy például az *Escherichia coli* magas ciprofloxacinnal szembeni rezisztenciája fluoroquinolonok szárnyas kultúrákban való felhasználásával függ össze (Rice 2003).

Ahhoz hogy megértsük a rezisztencia mechanizmusokat, ismerni kell az antimikrobiális szerek hatásmechanizmusát. A baktériumok elleni antibiotikumok aktivitása lehet a sejtfal szintézis zavarása (például a béta-laktámok és glikopeptidek), a fehérjeszintézis gátlása (makrolidek, aminoglikozidok és tetraciklinek), a nukleinsav szintézis akadályozása (fluoroquinolonok és rifampicin), az anyagcsere útvonalak gátlása (trimetoprim-szulfametoxazol) és a membrán struktúra megbontása (polymyxinek és daptomicin) (Tenover 2006). Ezen hatások kivédésére a baktériumok többféle módszert alkalmaznak: például sztreptomycin vagy eritromicin rezisztencia esetén pontmutációt a 16S rRNS-t kódoló génen (Springer 2001), (Sigmund 1982). További lehetőségek olyan enzimeket kódoló gének "összeszedése", melyek lebontják, inaktíválják vagy eltávolítják az antibiotikumot. Előbbiek a béta-laktám típusú antibiotikumokra (mint amilyen az ampicilin) és az aminoglikozidokra (például kanamicin) jellemző rezisztencia mechanizmusok, melyek során plazmidon kódolt béta-laktamáz illetve aminoglikozid módosító enzimek jutnak be a baktériumsejtbe (Sutcliffe 1978), (Shaw 1993). Utóbbi a

tetraciklin rezisztencia egyik speciális változata, amikor membránkapcsolt úgynevezett efflux fehérjék felismerik és a sejtől exportálják az antibiotikumot (Speer 1992).

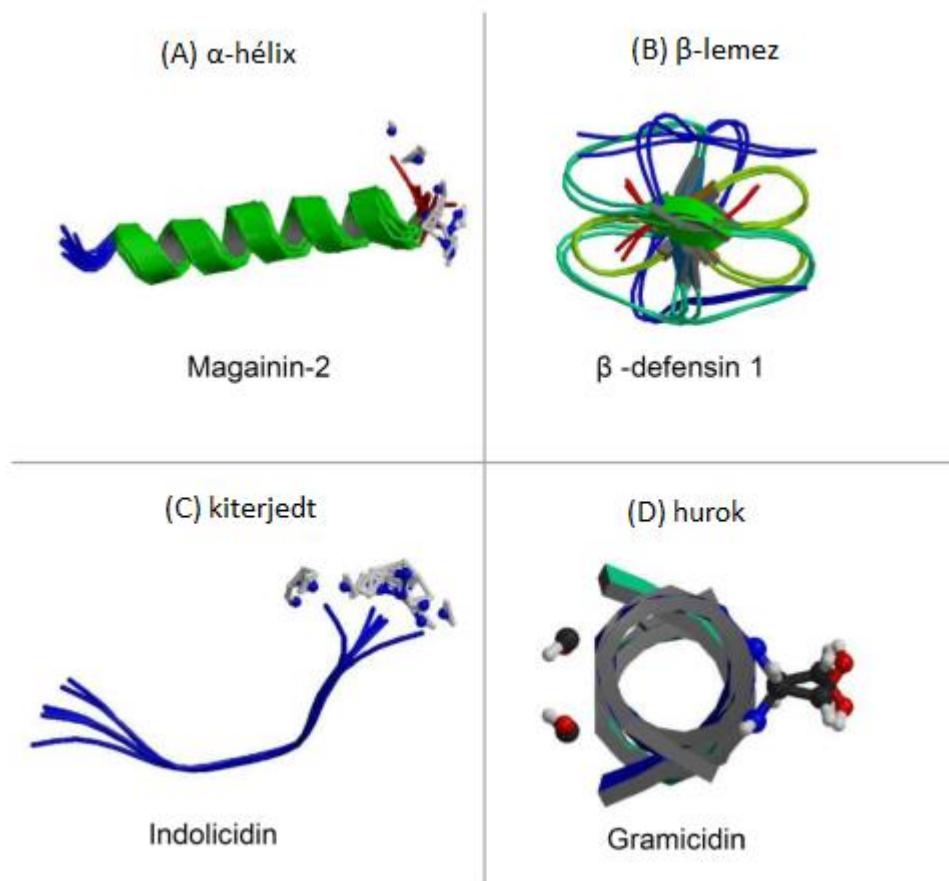
Amint már említettük, az antibiotikum rezisztencia nem csak a baktériumokat érinti. Egyre több tanulmány számol be olyan patogén gomba izolátumokról, melyekkel szemben az általánosan használatos antifungális szerek hatástalannak bizonyulnak. Több beszámoló is megjelent például a candida ellenes szerekkel szemben kialakult rezisztenciákról. Felbukkantak olyan azol-rezisztens *C. albicans* törzsek, melyek pontmutációt hordoztak ezen gombaellenes szerek célpont molekulájában az ergosterol bioszintézisében szerepet játszó Erg1 lp-ben, vagy túlexpresszálták azt, csökkentve ezáltal a flukonazol kötődését (Akins 2005), (Sanglard ésOdds 2002). A poliénekekkel és az echinokandinokkal szembeni rezisztencia ritka, azonban a plazmamembrán ergosterol tartalmának csökkentésével (az ERG3 gén mutációján keresztül), vagy a sejtfal 1,3- β -D-glükán komponensének szintézisében szerepet játszó GSC1 gén mutációjával kialakulhat amfotericin B, illetve caspofungin rezisztencia (Cannon, Lamping mtsai. 2007), (Baixench, Aoun mtsai. 2007). Előbbi azol rezisztenciát is eredményez. Az antifungális rezisztencia különösen problémás a terápia szempontjából, mivel a szisztémás gombafertőzés korai felismerése késhet, és kevés gombaellenes szer áll rendelkezésre. Mindamellet, a hosszantartó terápia nem kívánt mellékhatásokat is okozhat.

1.3 Antimikrobiális peptidek

A mikrobákkal szembeni drog rezisztencia globális méretű népegészségügyi problémává vált napjainkra, így szükségszerű új antimikrobiális szereket bevetni az egyre növekvő rezisztenciával szemben. Az antimikrobiális peptidek (AMP), mint újgenerációs antibiotikumok, hatékony megoldást nyújthatnak az antibiotikum rezisztencia problémakörének megoldására (Giuliani, Pirri mtsai. 2007). Antimikrobiális peptideket a baktériumoktól kezdve minden rendszertani kategóriába tartozó élőlények termelnek, növényekben, illetve gerinces és gerinctelen állatokban ezen vegyületek a veleszületett immunitás effektor molekulái (Maroti, Kereszt mtsai. 2011). Vannak közöttük vírus, baktérium, protozoa és gomba ellenes aktivitással rendelkezők (Shai 2002), valamint olyanok, melyek antibakteriális és antifungális hatással egyaránt bírnak. Széles hatásspektrumuknak és a rájuk jellemző gyors ölő, vagy gátló aktivitásuknak köszönhetően

ezek a természetes molekulák ígéretes jelölteknek tekinthetők a kórokozókkal szembeni harcban.

Az AMP-k kis, amfipatikus molekulák (ennek megfelelően hidrofil és hidrofób régióval egyaránt rendelkeznek), melyek aminosav összetétele és hossza rendkívül változatos (6-tól 100 aminosavig) (Peters, Shirliff mtsai. 2010). Sok közülük pozitív töltésű. Másodlagos szerkezetüket tekintve négy csoportba oszthatók (1. ábra): β -lemez, α -hélix, hurok és kiterjedt peptidek (Giuliani, Pirri mtsai. 2007).



1. ábra: Antimikrobiális peptidek szerkezet szerinti csoportosítása: α -hélixek (A); β -lemezek sorozatából felépülő peptidek (B); szokatlan szerkezettel, mint például kiterjedt hélixel rendelkező peptidek (C); és hurokba rendeződött peptidek (D).

Aminosav összetételük alapján szintén négyféleképpen csoportosíthatók (Brogden 2005). Egyik alcsoportot képezik az anionos, glutaminsavban és aszparaginsavban gazdag AMP-k. Ezek 700-800 Da nagyságú peptidek, melyek mM-os koncentrációban termelődnek gerinctelenekben, növényekben, emberben pedig a surfactant és a bronchoalveoláris folyadék tartalmazza, valamint a légúti epitél sejtek termelik (Brogden,

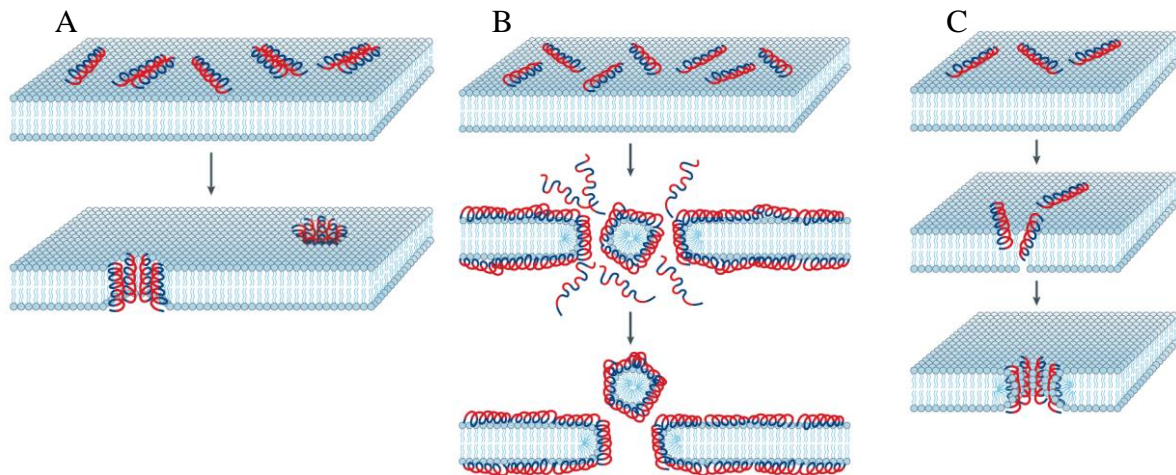
Ackermann mtsai. 1999). Ide tartozik például a kétéltűek maximin H5 nevű peptidje (Lai, Zheng mtsai. 2002), vagy a humán dermicidin (Schitteck, Hipfel mtsai. 2001). Antimikrobiális aktivitásukhoz cinket igényelnek kofaktorként. Egy másik csoport a kationos AMP-k egy részét öleli fel (~ 290), melyek rövidek (< 40 aminosav), nem tartalmaznak ciszteineket. Vizes közegben legtöbbjük rendezetlen szerkezetet mutat, de trifluoroetán, SDS micellák, foszfolipid vezikulumok és liposzómák jelenlétében a molekula egy része, vagy teljes egésze α -hélixé rendeződik (Gennaro és Zanetti 2000). Az α -hélix szerkezet rendezettségi mértéke minél fokozottabb, annál erőteljesebb a peptid antimikrobiális aktivitása (Brogden 2005). Ilyen például a humán cathelicidin, az LL-37, mely akut gyulladásos folyamatok során magasan expresszált és a membrán permeabilizálásával végez a mikrobákkal (Bjorstad, Askarieh mtsai. 2009). A harmadik csoport a kationos AMP-knek egy kisebb csoportja (~ 44), melyek jellegzetessége, hogy bizonyos aminosavakban gazdagok. Ilyen a szarvasmarha bactenecin, vagy a sertés PR-39 nevű AMP-je, amik prolin és arginin gazdag peptidek; a prolin és fenilalanin gazdag profenin (sertés); vagy a triptofán gazdag indolicidin (szarvasmarha). Erre a csoportra ugyancsak jellemző, hogy nem tartalmaznak ciszteineket és többnyire lineárisak. Az AMP-k negyedik csoportja olyan anionos és kationos peptidekből áll, melyek cisztein tartalmúak és ezáltal diszulfid hidak stabilizálják ezeket a molekulákat. Ide tartozik a sertés leukociták által termelt protegrin és a defenzinek sokféle csoportja, így az α - és β -defenzinek, a rovar és növényi defenzinek, valamint a rhesus majom θ -defenzine.

Az egyes AMP-k ölési sebessége igen eltérő lehet. Néhány α -helikális peptid, mint például az egyik csirke cathelicidin, a fowlicidin-3 (Bommineni, Dai mtsai. 2007) olyan gyorsan fejt ki baktériumölő hatását, hogy a sejthalált megelőző lépések csak nehezen követhetőek nyomon (Boman 1995). Más peptideknek, mint például a cecropin P1, vagy a PR-39 –nek 15-90 perc szükséges az ölő hatás kifejtéséhez (Boman, Agerberth mtsai. 1993). Eltekintve az időtől és a specifikus hatásmechanizmusoktól, bizonyos lépéseknek be kell következniük ahhoz, hogy megtörténjen a sejtölés. Ezek a lépések pedig a következők: vonzás, tapadás/kötődés, inszertálódás és membrán permeabilizálás.

A vonzás során elektrosztatikus kölcsönhatás alakul ki az anionos vagy kationos peptid és a célsejt felszíni struktúrái között. A kationos AMP-k a baktérium negatív töltésű külső membránjához vonzódnak. A Gram-negatív baktériumoknál az anionos foszfolipidekhez, vagy a lipopoliszacharidok foszfát csoportjához, Gram-pozitív baktériumoknál pedig a peptidoglikán rétegeket összekötő teikonsavhoz (Brogden 2005).

Egyféle, vagy kevert lipideket tartalmazó membránokkal vagy vezikulumokkal inkubáltatva az antimikrobiális peptideket kimutatták, hogy két, fizikailag eltérő módon képesek kötődni (Huang 2000). Az egyiket felületi, vagy S (mint surface) állapotnak nevezzük, amikor alacsony a peptid és a lipid egymáshoz viszonyított aránya. Ilyenkor az α -helikális és β -lemez másodlagos szerkezettel rendelkező peptidek, valamint a θ -defenzinek a lipid fejcsoportokon adszorbeálódnak, majd funkcionálisan inaktív módon beágyazódnak és ezzel megnyújtják a membránt. A membrán elvékonyodás mértéke peptid-, illetve koncentrációfüggő. A peptidek ebben az állapotban a lipid kettős réteggel párhuzamosan helyezkednek el. A másik kötődési mód az inszerciós, vagy I (mint insert) állapot. Ebben az esetben magas a peptid és lipid egymáshoz viszonyított aránya. Ahogy nő a peptid/lipid arány, úgy kezd a peptid egyre merőlegesebben állni a membránhoz képest. Végül a peptid molekulák a lipid kettős rétegbe inszertálódnak és transzmembrán pórusokat képeznek (Brogden 2005).

A membrán permeabilizálás többféle képpen is végbemehet (2. ábra). A „hordó donga” modell szerint, a peptid hélixek köteget képeznek a membránban, középen egy lumennel. A hidrofób peptid régiók a kettős réteg lipid kór-régiójához illeszkednek, a hidrofil peptid régiók pedig a pórus belsejét alkotják. Ezt a típusú transzmembrán pórust eddig egyedül a *Trichoderma viride* által termelt alamethicin esetén írták le. A „szőnyeg” modell esetén a peptidek, mint az ovispirin, a kettős réteg felszínén akkumulálódnak, és magas peptid koncentrációnál detergens módjára áttörik a membránt, és így micellák képződnek. A „tórusz-pórus” modell alapján, az antimikrobiális peptid hélixek a membránba inszertálódnak és indukálják a lipid monolayer-ek folyamatos behajlását végig a póruson keresztül, így a pórus belsejében a vizes fázist az inszertálódott peptidek és a lipid fejcsoportok is szegélyezik. Ily módon képeznek transzmembrán pórust a magaininek, protegrinek, vagy a mellitin.



2. ábra: Antimikrobiális peptidek által indukált ölés lehetséges módjai: A) „hordó donga” modell: a hidrofíli peptid régiók (pirossal jelölve) a pórus belseje felé, a hidrofób régiók (kézzel jelölve) a lipid kór-régió felé néznek. B) „szőnyeg” modell: a peptidek parallel helyezkednek el a lipid kettős réteg felszínén és egy kiterjedt réteget alkotnak, mint egy szőnyeg. C) „tórusz-pórus” modell.

Amilyen sokrétűek maguk az AMP-k, olyan változatos a hatásmechanizmusuk is. A mikrobák pusztulását nem csak az ionsatornák és transzmembrán pórusok képzésén, valamint a kiterjedt membrán károsodások előidézésén keresztül érhetik el, hanem más, intracelluláris célpontjai is lehetnek az AMP-knek. Ehhez azonban mindenképpen át kell jutniuk a membránon, ám ez az átjutás nem feltétlen kell, hogy a membrán permeabilizációját okozza. Vannak peptidek, amik endocitózissal (Richard, Melikov mtsai. 2003), mások makropinocitózissal (Wadia és Dowdy 2005), vagy valamilyen permeáz/transzporter közvetített mechanizmussal (Casteels, Ampe mtsai. 1993) transzlokálódnak. Az így bejutott peptidek gátolhatják a DNS, RNS, vagy fehérje szintézist, blokkolhatják chaperon fehérjék és például olyan enzimek működését, melyek a sejtfal struktúrák megfelelő kialakításához szükségesek. Vannak olyan peptidek is, melyek a mitokondriumot veszik célba, ahol vagy gátolják a sejtlégzést és indukálják reaktív oxigén gyökök képződését, vagy megbontják a mitokondrium membránjának integritását és ezáltal ATP és NADH kiáramlást eredményeznek (Peters, Shirliff mtsai. 2010).

Az antifungális AMP-k hatásmechanizmusuk alapján két nagy csoportba sorolhatók: vannak a lítikus peptidek és a sejtfal szintézis gátlók. Az első csoportba tartoznak többek között a defenzinek, melyek számos organizmusban megtalálhatóak, a rovarok által termelt cekropinok, vagy a kételtűek által termelt magaininek. A második

csoport képviselői például a kitin szintáz gátló nikkomicinek és polioxinok, illetve a glükán szintézist gátló echinocandinok (de Lucca, Walsh 1999).

Terápiás szempontból az AMP-k óriási előnye a szelektív toxicitás. Egy antimikrobiális ágenssel szemben ugyanis esszenciális feltétel, hogy emlős sejtekre ne legyen toxikus. Alapvető különbségek vannak az emlős és mikroba sejtek között, melyek meghatározzák a szelektivitást. Ilyen szelektivitási faktor a membrán összetétel, a transzmembrán potenciál, a polarizáció és a membrán szerkezeti jellegzetességei (Bradshaw 2003), (Yeaman és Yount 2003). Az AMP-k további előnye, hogy nem csak önmagukban alkalmazhatóak, hanem a már használatban levő antibiotikumokkal együtt alkalmazva szinergista hatás érhető el velük. A legújabb tanulmányok pedig arról számolnak be, hogy antimikrobiális aktivitásukon túl, milyen más alternatív funkciókat láthatnak még el. Ezek közt szerepel immunmódosító aktivitás (Mookherjee és Hancock 2007), endotoxin semlegesítés (Peters, Shirliff mtsai. 2010), sebgyógyulás (Steinstraesser, Koehler mtsai. 2008), tumor ellenes hatások (Mader és Hoskin 2006). Ezen kívül még fontos megemlíteni, hogy nagyon ritka az AMP-kel szembeni rezisztencia kialakulása (Peschel és Sahl 2006). Mindezeket a tulajdonságokat együttevén, jelenleg az AMP-k képviselik az egyik legígéretesebb stratégiát a fertőzésekkel és a rezisztens mikrobákkal szemben.

1.4 Antimikrobiális peptidekkel szemben kialakuló rezisztenciák

A fertőző mikroorganizmusoknak nemcsak terápiás céllal a környezetükbe juttatott antimikrobiális ágensek hatását kell kivédeniük, hanem a versenytársaik vagy éppen az általuk megtámadott szervezetek által termelt, legtöbbször peptid típusú vegyületek, összefoglaló néven antimikrobiális peptidek aktivitásával is meg kell küzdeniük. Az antimikrobiális peptideknek kitett patogének két alapvetően különböző stratégiával képesek túlélni. E kettő a konstitutív rezisztencia és az indukálható rezisztencia jelensége. A konstitutív, vagy más néven passzív rezisztencia mechanizmusok egy adott organizmus jellemzői, melyek AMP hiányában is kifejeződnek. Az indukálható, vagy adaptív rezisztencia mechanizmusok az AMP-k által kiváltott, vagy a célsejtet ért stresszre adott válaszokat foglalják magukban.

Minthogy az AMP-k hatásmechanizmusuk során kölcsönhatásba kerülnek a cél patogén külső felszínével, így a passzív rezisztencia egyik lehetséges formája, hogy a

mikróba felszíne eleve nem rendelkezik elektrosztatikus affinitással a kationos AMP iránt, sőt akár taszíthatja is azt (Yeaman és Yount 2003). Ennek adaptív megfelelője, mikor a mikroba valamilyen úton csökkenti a felszíni negatív töltését. Például a *Staphylococcus aureus* a citoplazmából a felszíni teikonsavhoz történő D-alanin transzportálással képes csökkenteni a felszíni negatív töltést és ezzel defenzinek, protegrinek és más AMP-k ellen alakít ki rezisztenciát (Peschel, Otto mtsai. 1999).

Passzív rezisztenciát okozhat a sejtek csökkent/nyugvó metabolikus állapota is. Ennek megfelelően például a sejtlégzés folyamatában gátolt, vagy alacsony hőmérsékleten tartott *C. albicans* érzékenysége szignifikánsan csökkent hisztatin-5-tel szemben, akárcsak azoknak a petit mutánsoknak, melyek mitokondriális DNS-e hordozott valamilyen, a sejtlégzést érintő mutációt (Gyurko, Lendenmann mtsai. 2000).

Szintén az AMP-k kezdeti felszíni kapcsolódását kihasználva indukálható rezisztencia alakul ki az extracelluláris szerkezet módosításával, mint például a lipopoliszacharid Lipid A egységének megváltoztatásával. A Lipid A acil csoportjai között a hidrofób kölcsönhatások számának növelésével ugyanis csökken a külső membrán fluiditása és ez gátolja az AMP-k kapcsolódását/inszercióját a külső membránhoz/ba és ezáltal a pórus formálást (Brogden 2005). Ez a fajta rezisztencia mechanizmus megfigyelhető Gram-negatív baktériumoknál, mint például *Salmonella* fajoknál. Az adaptív rezisztencia egy másik formája, ha a mikroba proteolitikus enzimeket, így proteázokat, vagy peptidázokat termel, melyek lebontják az AMP-ket (Groisman 1994). A különféle transzporterek ugyancsak összefüggésbe hozhatók AMP rezisztenciákkal, mind baktériumoknál mind pedig patogén gombák esetében. Ilyen a *Yersinia* RosA és RosB proteinekből felépülő kálium antiporter rendszere, mely az AMP-k kiáramoltatását végzi a baktérium sejtekből (Stumpe és Bakker 1997), vagy a gombáknál az ABC-transzporterek (ATP-binding cassette), melyek egyéb antifungális szerekkel szemben is rezisztenciát biztosítanak (Andrade, Del Sorbo mtsai. 2000). Erre példa a Cdr1p vagy a Cdr2p pumpák, melyek túlzott expressziója a plazmamembránban szintén azol rezisztenciához vezet (Perea, Lopez-Ribot mtsai. 2001).

1.5 Antimikrobiális peptid szerű molekulák szimbiózisban betöltött szerepe

Növényi antimikrobiális peptideket már izoláltak a növény minden részéből, így a gyökérből, a szárból, levélből, virágból és a magból is. A nemrégiben azonosított

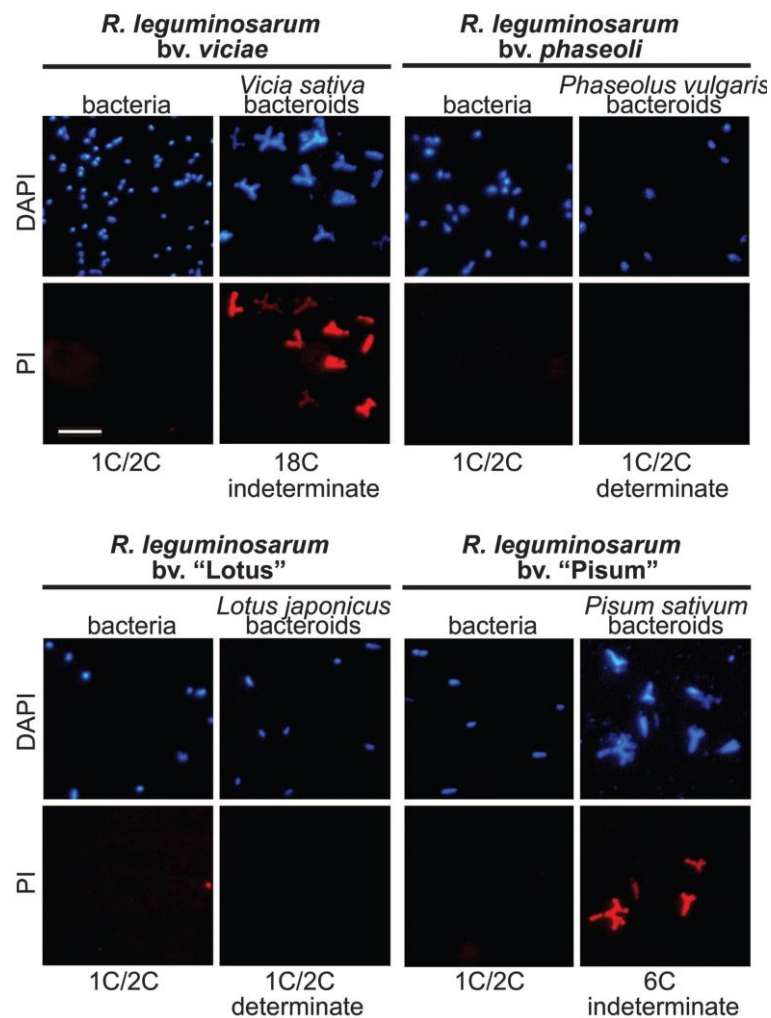
gümőspecifikus ciszteinben gazdag peptideket (nodule-specific cysteine rich peptides), röviden NCR-eket bizonyos pillangós virágú növények a gyökerükön fejlődő szimbiotikus szerv, a nitrogénkötő gümő sejtjeiben termelik.

A pillangós virágú növények növekedésük során korlátozott nitrogén ellátottság mellett szimbiotikus kapcsolatot alakítanak ki a talajban élő, az α - és β -proteobaktériumok közé tartozó Gram negatív baktériumokkal, melyek közül legismertebbek a *Rhizobiaceae* családba tartozó *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium*, stb. fajok. Ezek endoszimbionta mikroorganizmusok, melyek szimbiotikus kapcsolatuk kialakításakor igen magas szintű gazda-specifitást mutatnak. A szimbiózis eredményeként egy új szerv fejlődik ki a növény gyökerén, amit gümőnek neveznek. Ebben az új szervben a rhizobiumok nitrogénkötő bakteroiddá differenciálódnak és a növény számára hasznosítható nitrogénforrást biztosítanak, cserébe pedig a gazdanövény ellátja őket szénforrással. A baktériumok a leginkább ismert szimbiotikus kapcsolatok esetén egy infekciós fonálnak nevezett csőszerű struktúrán keresztül jutnak be a fejlődő gümő belsejébe, mely a gyökérszőr sejtek membránjának betüremkedésével és növekedésével alakul ki, s melybe a sejttel komponenseihez hasonló anyagok rakódnak le. A baktériumok a gümő sejtjeinek citoplazmájába egy endocitózishoz hasonló folyamattal, azaz egy peribakteroid membránnak nevezett növényi membránnal körülvéve jutnak be. Ennek köszönhetően a növényi citoplazmában található több ezer bakteroid topológiailag extracellulárisan helyezkedik el.

A gümőknek két fő típusát különböztetjük meg: determinált és indeterminált (Hirsch 1992). A determinált gümők általában trópusi és szubtrópusi pillangós virágúak gyökerén, mint például szóján, míg az indeterminált gümők a mérsékelt övi pillangós virágú növényeken képződnek, így lucernán, borsón. A két típus közötti különbség már a kialakulásuk helyében megmutatkozik: a determinált gümő primordium a gyökér külső kérgi részén jelenik meg, míg az indeterminált gümő a központi hengert körülvevő endodermiszen. Ez utóbbinál is aktiválódnak a külső kéreg sejtjei és egy preinfekciós hidat alkotnak az infekciós fonál és a gümő primordium között. A másik jelentős különbség a két gümő között, hogy a determinált gümő merisztematikus aktivitását hamar elveszíti a kezdeti lépéseket követően, így növekedés csak a sejtek táulásával valósulhat meg. Ezzel szemben az érett indeterminált gümőben egy állandóan jelenlévő apikális merisztéma biztosítja a gümő növekedését. Az ilyen típusú gümők a sejtek differenciáltsági állapotától függően öt részre oszthatók fel: I. zóna a merisztéma, II. az infekciós zóna, ahol az

infekciós fonálból a baktériumok a növényi sejtekbe jutnak, III. a fixációs zóna, ahol a nitrogénkötés történik. A II. és III. zónák között megfigyelhető egy átmeneti zóna, melyben amiloplasztok akkumulálódnak és ahol a rhizobiumok bakteroiddá differenciálódnak. Az ötödik rész az öregedő zóna, ahol a bakteroidok és a növényi sejtek lebomlanak. A merisztéma és a nitrogénkötési zóna között a növényi sejtek is differenciálódnak, genomjuk osztódás nélkül replikálódik, s ezen endoreduplikációs ciklusok révén egyre nagyobb DNS-tartalmú, akár 64-128 genom kópiát tartalmazó sejtek alakulnak ki. Ez az átalakulás a DNS-tartalom megváltozása mellett nemcsak a sejt méret megnövekedésével, hanem nagyfokú génexpresszióbeli és fiziológiai változásokkal is jár. Úgy vélik, hogy a szimbiotikus sejtek fertőzése az infekciós fonálról lefűződő rhizobiumokkal, valamint a szimbioszómák képződése, kiváltó okai lehetnek annak a két részletben megvalósuló transzkripciós „programcsomag” első hullámának, amely a vad típusú gümő kialakulását szabályozza. Továbbá úgy tűnik, hogy ahhoz, hogy a második transzkripciós hullám is megvalósuljon, a szimbiotikus sejtekben a bakteroidok differenciálódásának elindulása, a baktérium sejtek megnyúlása szükséges (Maunoury, Redondo-Nieto mtsai. 2010).

A pillangós virágúak egy speciális csoportjánál, a kloroplasztisz genom egyik fordított ismétlődését elvesztő kládnál (IRLC, azaz Inverted Repeat Lacking Clade; ide tartozik például a lucerna, a borsó, a lóbab, a fehérhere) a szimbionta baktérium bakteroiddá történő differenciációja a baktérium genom amplifikációjával és ezzel egyidejűleg a baktériumok megnyúlásával, elágazódásával jár, ellentétben más pillangós virágúakkal (mint például szója, kerep, vagy bab), ahol a nitrogénkötést végző bakteroidok a szabadon élő baktériumokhoz hasonlóak (3. ábra). Ez az endoreduplikációs ciklusokkal előidézett bakteroid differenciáció növényi faktorok által irányított, melyek csak az IRLC tagjainak gümőiben vannak jelen, a többi pillangós virágú növény gümőiből hiányoznak (Mergaert, Uchiumi mtsai. 2006).



3. ábra: Különböző bakteroid differenciáció indeterminált és determinált gümőkben: az IRLC csoportba tartozó *V. sativa* és *P. sativum* gümőkben a bakteroidok megnyúltak és jellegzetes Y-elágazódást mutatnak, valamint a DNS tartalom megemelkedett a szabadon élő formához képest. A nem az IRLC kládba tartozó *Ph. vulgaris* és *L. japonicus* gümőkből izolált bakteroidoknak azonban a szabadon élő rhizobium kultúrával azonos a morfológiájuk és DNS tartalmuk (Mergaert, 2006).

A nitrogén-fixáló gyökérgümő kialakulásában és ezen belül a bakteroidok differenciálódásában számos, úgynevezett gümő-specifikus peptid (nodule-specific peptide, nsPEP) vesz részt. Ezek kezdeti/első azonosítása a 2000-es évek elején történt, amikor *Medicago truncatula*-ban találtak 42 cDNS-t, melyek a gümő képződése során indukálódtak és semmilyen addig ismert szekvenciával nem mutattak homológiát (Gyorgyey, Vaubert mtsai. 2000). A 42 feltételezhetően kódolt fehérje szekvenálása során kiderült, hogy 19 hasonló jelleget mutat és ugyanabba a fehérjecsaládba sorolható, mivelhogy ezek mind kis méretűek (70 aminosav körüliek), konzervált szignál peptiddel

rendelkezik és a C-terminális doménjük konzervált pozíciókban ciszteineket tartalmaz. Tehát a gümőben történő expressziójukról és cisztein tartalmukról kapta a család az NCR elnevezést. Az NCBI adatbázisában történő BLAST keresések alapján a pillangós virágúak IRLC csoportján kívül nem találtak NCR homológokat sem szójabab, *L. japonicus*-ban, vagy *Arabidopsis*-ban, sem pedig más növényekben (Mergaert, Nikovics mtsai. 2003).

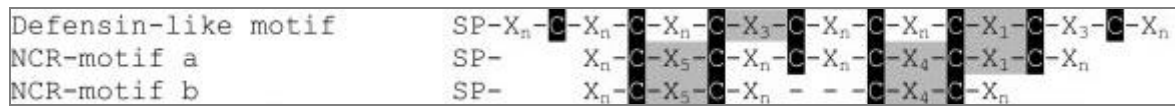
Az NCR-ek mellett EST adatbázisok és genom szekvenciák alapján az nsPEP-eknek egy másik családját is azonosították *Medicago*-ban, melyet glicinben gazdag fehérjék (Glycine-Rich Proteins, GRP) alkotnak (Kevei, Vinardell mtsai. 2002), (Alunni, Kevei mtsai. 2007). Egy harmadik, és egyben a legkisebb géncsalád kis, savas oldalláncokkal rendelkező peptidekből áll (Small Nodule-specific Acidic Peptide, SNAP).

Az nsPEP-ek legnagyobb családját a már fentebb említett cisztein-gazdag peptidek (NCR-ek) alkotják (Mergaert, Nikovics mtsai. 2003), melyekből az IRLC csoportba tartozó *M. truncatula*-ban mára már több mint 450-et azonosítottak (Kereszt, Mergaert mtsai. 2011). Az NCR gének rövid, 30-50 aminosav hosszúságú szekretált peptideket kódolnak, melyeknek érett formájában négy vagy hat cisztein konzervált elrendeződést mutat (4. ábra), ennek függvényében két csoportra oszthatók: A és B csoport. Az „A” csoportban az első két cisztein között (C1 és C2) öt aminosav távolság van, míg az utolsó kettő között (C4 és C5) négy. A „B” csoport további két ciszteinje (C3 és C6) közül a C3 a C2 és C4 között helyezkedik el, peptidenként változó távolságban, a C6 pedig egy aminosav távolságra van a C5-től. A szekvencia többi része jelentősen eltér a családon belül. Éretlen formában mindegyik NCR peptid hordoz egy 20-29 aminosavból álló hidrofób amino terminális domént, amely nagy valószínűséggel szignál peptidként (ábrán aláhúzva) funkcionál. Ez a domén tereli az NCR-eket az endoplazmás retikulumban (ER) a megfelelő szekréciós útvonalba, melynek szignál-peptidáz komplexe lehasítja a szignálpeptidet az amino terminális végről az ER lumenébe történő bejutás során. Ez a lépés elengedhetetlen a peptidek helyes célbajuttatásához, a bakteroidokkal telt szimbioszómába.

Group A			
NCR096	MARTLKFFVYAVILFSLFLVAKG	DDVKIKCVVAANCPDLM	YPLVY
NCR002		RTEPMLTTYILLCVSEADCPKV	KPNYT
NCR001	MAQFLFLVYSILIFSLFLFGEA	AFERTETRMLTTPCTSDNCPKVI	SPCHT
NCR003	TQFLFLVYSILIFSLFLFGEA	ALERTRTTMLTSYNIQCKSDADCPKAI	EPHYT
NCR005		GEAALERTETTMHNVQPSHF	PCFTAADCPMID
NCR007	MAQFLFLVYSILIFSLFLFGEA	AYERTEPIMHNGEPINLPCVTVADCPRMD	EPLHM
NCR004	MAQFLFLVYSILIFSLFLFGEA	WFKRTETGEIIWVRCVTDIDCPKMG	EPQYF
NCR008	MAQFLFLVYSILIFSLFLFGEA	VFKRTETGEIIWVRCVTDIDCPKMG	EPMYF
NCR097	MSQIFMAYVILFSLFLFHVET	VFKRTETNIHKLGGCTSDCPVLG	
NCR068	SQILMEVYFFILFSLFLFVES	IKIFTEHRCTDADCPARE	LPEYL
NCR006	MAQVIMFVGAILFSLFLFVET		LPRYV
NCR011	MAQILFPLGAILFSLFLFVES	KQTNIPCKSADCPKPI	YERYV
NCR089	MAKTCKLVFALIFVSLFLVSMS	AELGGPCRSDBECPQLSLRFFAI	
NCR045	MADILKFWHVILFSLFLVII	VSSFIFPCITDRDQTLKKNKGK	
NCR036	MAKILKCVYVILFVSLFLVLTIDQAYF	NDPRPVSDKDCPRPKQKSNV	
NCR035	MVKTPKLVYVILFSLFLSMIVS	NSSFLGTFISSCKRDKCPKLYGANF	
NCR119	MGETPKLVYVILFSLFLCTNSSFS	QMINFRGCKRDKCPKRGVNI	
NCR100	MIETLKFFVYAVILFSLFLITSEVGG	LYGGCTDRDYPLANKTFYL	
NCR087	AHKLVIYILFSLFLVANNVEG	DIVCITDMDCEPNTLVQGY	
NCR095	MAEILKFTYNAILFSLFLFVIYG	ELVCDTDDDLKFFPDNPYPM	
NCR094	MSNTLMFVITLIVLFLGPKNVYA	FQPCVTTADCKMTLKTDENIY	
NCR113	MAKTLKVMYTVLFLSLFLVAKNVDA	YVWCETVDCFKSQYFIF	
NCR084	MTKILKFTICILFSLFLVAES	FATGMPCKTDRCEPNTSTHKY	
Group B			
NCR019	MKFTYINILFSLFLVQFLTC	KGLTVPCENPTTCEDF	CTPMT
NCR259	ALMIFLSILFVTS	NDKCTVAGDCDFFR	CPNTFV
NCR053	MTHISKFFVAILFSLFYGVNDC	KRIPCKDNDNNDNNWQLLA	CRFEREV
NCR054	YISKVYVAILFSLFYGVNDC	MLMTCEDHDFCRQNVQVVG	CSF-REIF
NCR269	MAIHKFTYINILFSLFLFVPTKVDGRITHDPSTRSTVSGGFKCVRDADQDEV		CSFGCNK
NCR122	MAVILKFFVYINILFSLFLYVVG	TRCNRDBDCEFI	CTGQIE
NCR164	MAAILKFFVYINILFSLFLVAVKA	FEECKEDADCEPVCVPGCSNICTHDP	TCIDNNCEFI
NCR158	MARILSFFYALLIFVSLFLVTNG	SLPDAPPCLFTPECPDM	CPDRTL
NCR162	MARILSFFYALLIFVSLFLVIAING	SLPDAPPCLFTPECPDM	CPDRTL
NCR150	MAGIPCFYGSILFSLFLAAFFKEGYM	IPCATSDDLKMN	CPPLTE
NCR160	MAQIPRYFAYITFLYLFHVATT	NRFLYRGGDTSNDCESYM	CPPLSE
NCR103	MAKIVNFVYSILFVSLFLVATKGGG	KPFLTRPYPCNTGSDCPQNM	CPFGYKE
NCR106	MAKIVNFYISILFSLFLVETNA	QCIYPACFKDHMCRLK	CSGRTB
NCR123	AKLVKLVYVITVYFLFLVATEIVSG	IPNDVDVCEQTL	CEQLIADFKYIDFKSBCVSRMCACTGSPV
NCR238	AKLMKLFYVMIHFLSLFLITNVRA	YDDCYNHTECNKIK	CVPERIA
NCR135	MAEIVKLIYVMIHFLFLVSMNVDA	SDECVKVSDFSPTKY	CLSGRRM
NCR133	MAQILILEYVMIHFLFLVSTNVDA	GRGRNVYDCKATY	CRAGSHRV
NCR156	MAEIVKFWNVILFSLFLPFAMTVDA	NMVICQDFDCQTKI	CEFDLQ
NCR200	MAKVTKSCYILFSLFLFLAMNVAGG	RECHANSHVCGKIT	CVLEQKE

4. ábra: *Medicago* NCR multigén család: a 42 legabundánsabb NCR két csoportba rendezve. Az A csoport négy, a B csoport hat ciszteint tartalmaz (feketével kiemelve). Ezen kívül a további azonos, konzervált pozícióban levő aminosavak (a szekvenciák legalább 60 %-a) is feketével, a hasonlóak szürkével vannak jelölve. Az aláhúzott szakasz a szignál peptidet jelöli (Mergaert 2003).

EST szekvenálási projektek, szekvencia elemzések alapján homológ szekvenciákat azonosítottak több, szintén az IRLC-ba tartozó pillangós virágú növényben, mint például a lóbabban (*Vicia faba*), borsóban (*Pisum sativum*), fehér herében (*Trifolium repens*), vagy kecskerutában (*Galega orientalis*). Azonban más, távolabbi rokonságban álló pillangós virágúak genomja, mint a szójái (*Glycine max*), szarvaskerepé (*Lotus japonicus*), vagy a közönséges babé (*Phaseolus vulgaris*) nem tartalmaz NCR géneket (Alunni, Kevei mtsai. 2007). Az NCR-ek más peptidekkel legfeljebb kis mértékben mutatnak szekvencia homológiát, ám a fehérje szerkezet alapján növényi és állati defenzinekhez hasonlíthatók (5. ábra). Ennek megfelelően antimikrobiális hatással is rendelkezhetnek.



5. ábra: Konzervált cisztein motívumok a defenzin-szerű és az NCR-típusú polipeptideknél. A konzervált távolságok szürkével vannak kiemelve (Mergaert 2003).

Számos, különböző fejlődési állapotban akadályozott baktérium és növényi mutáns vonal közötti szimbiotikus kölcsönhatás transzkriptom analízise valamint promóter-riporter génfúziók és *in situ* hibridizációs kísérletek alapján úgy tűnik, hogy az *NCR* gének expressziója kimondottan a gümő szövetekben aktív és a szimbiotikus sejtek kialakulásával, valamint a bakteriális infekcióval hozhatók összefüggésbe, csak a fertőzött sejtekben nyilvánulnak meg (Maunoury, Redondo-Nieto mtsai. 2010), (Van de Velde, Zehirov mtsai. 2010).

Az egyes *NCR* gének különböző sejtrétegekben és a gümő eltérő zónáiban szekvenciálisan expresszálódnak, azaz az egyes (különböző ploidia-szintű) sejtrétegekben más és más összetételű peptid "koktélok" termelődnek. Ez azt jelzi, hogy a különböző peptidek illetve peptid keverékek különböző szerepeket tölthetnek be a szimbiózis kialakulása során. Molekuláris biológiai, immunológiai és biokémiai módszerekkel sikerült kimutatni, hogy egyes *NCR* peptidek a szimbioszómán belül, a bakteroidokban halmozódnak fel és szabályozzák azok terminális differenciációját (Van de Velde, Zehirov mtsai. 2010), melynek során a rhizobiumok sejtciklusa gátlódik a sejtosztódás szakaszában, így a többszöri genom replikációt követően a sejtek megnyúlnak, poliploidok lesznek (Mergaert, Uchiumi mtsai. 2006). Ezt a tényt erősíti az a kísérlet, melyben az amúgy reverzibilis bakteroid differenciációt mutató *L. japonicus* növénybe *NCR* géneket transzformáltak. A reverzibilisen differenciálódott bakteroidokra jellemző a szabadon élő baktérium kultúrával azonos morfológia és DNS tartalom. Ezzel szemben, a transzgénikus *Lotus* gümőkben a bakteroidok jelentősen megnyúltak és membrán permeabilitásuk is megváltozott, akárcsak az IRLC-specifikus bakteroidoké (Van de Velde, Zehirov mtsai. 2010). Ehhez hasonlóan, ha rhizobium kultúrát *in vitro* *NCR* peptidekkel kezelünk, bakteroidokra emlékeztető változásokat figyelhetünk meg, úgymint megnövekedett membrán permeabilitás, a DNS tartalom sokszorozódása, sejt megnyúlás és gátolt sejtosztódás. A baktérium szimbionta terminális differenciációja evolúciós előnyt jelenthet mind a baktérium, mind a növény számára. A megnövekedett poliploid sejtek ugyanis magasabb metabolikus aktivitással rendelkeznek, ami eredményesebb nitrogénkötést tesz

lehetővé (Kondorosi és Kondorosi 2004). Tehát, az NCR peptidek úgy tűnik, nagymértékben hozzájárulnak a szimbiotikus hatékonyság javításához. Ezt jól szemlélteti Oono és Denison kísérlete (2010), melyben összehasonlították két rhizobium törzs szimbiotikus hatékonyságát olyan gazdanövényekben, melyek reverzibilis bakteroid differenciációt (ezek voltak a tehénbab és a bab), és amelyek terminális differenciációt (a földimogyoró és a borsó) engednek meg. Mérték a gümő tömeget a növénytömeghez viszonyítva, és a nitrogén aktivitást a felhasznált szénforrás mennyiségének függvényében. Azt tapasztalták, hogy a terminálisan differenciálódott bakteroidok mind a borsóban, mind pedig a földimogyoróban felülmúlták a bab és a tehénbab bakteroidjait (Oono és Denison 2010).

Még eddig nem teljesen tisztázottak, hogy mely bakteriális faktorok vesznek részt az NCR peptidekre adott bakteriális válaszok során. Ilyen potenciális faktor a rhizobium *bacA* génje, mely elengedhetetlen a hatékony szimbiózis kialakulásához *S. meliloti* és növényi partnere a lucerna között. A BacA membrán fehérje bizonyítottan szükséges a bakteroid differenciációhoz az NCR termelő növényekben (Karunakaran, Haag mtsai. 2010), így ezeknél a *bacA* mutáns nem képes terminális differenciálódásra.

1.6 Gümőspecifikus ciszteinben gazdag peptidek eddig megismert antimikrobiális tulajdonságai

Szintetikus NCR peptidek *S. meliloti* szimbionta partnerre gyakorolt hatásainak *in vitro* vizsgálata során kiderült, hogy a szabadon élő kultúra a terminális differenciálódás egyes sajátosságait produkálja, úgymint alacsonyabb koncentrációban a sejtosztódás gátlása és a sejt DNS tartalmának megnövekedése, míg magasabb koncentrációban a megnövekedett membrán-permeabilitás, illetve az életképesség elvesztése. Az utóbbiak jellegzetesen az AMP-k hatásai (Van de Velde, Zehirov mtsai. 2010). Ezek és a defenzinokkal mutatott szerkezeti homológia alapján az NCR-eket az AMP-k csoportjába sorolhatjuk. Az NCR-ek ölü kapacitása peptid és koncentráció függő (Van de Velde, Zehirov mtsai. 2010), (Haag, Balaban mtsai. 2011). Ennek megfelelően, a korábbi kísérletekben, a defenzinokhoz hasonlóan, csak a kationos NCR peptidek, mint például az NCR035, NCR055, vagy az NCR247 mutattak rhizobium elleni aktivitást, ami csak magasabb koncentrációk alkalmazásakor (12-20 μ M) volt tapasztalható.

Csoportunk kimutatta, hogy két kationos NCR peptid antibakteriális hatású több különböző Gram pozitív és Gram negatív baktérium fajjal szemben is. Két növénypatogén

baktérium, a *Xanthomonas campestris* és a *Clavibacter michiganensis* kimondottan érzékenynek bizonyult a vizsgálatban szereplő NCR247 és NCR335 peptidekkel szemben, míg a szintén növénypatogén *Agrobacterium tumefaciens* és a humán patogén *Listeria monocytogenes* enyhe rezisztenciát mutatott. A többi vizsgált baktérium, mint a *Salmonella typhimurium*, az *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, vagy a *Bacillus cereus* pedig vagy egyik, vagy másik peptidre volt erősen érzékeny (Tiricz, Szucs mtsai. 2013).

Pontos hatásmechanizmusuk még eddig nem ismert. A vizsgált baktériumok eltérő érzékenységeinek egyik lehetséges oka, hogy az egyes peptideknek más és más célpontjai lehetnek, vagy egy adott célponthoz, ami esetleg változó mennyiségben van jelen, vagy különbözőképpen hozzáférhető az egyes fajok esetében, eltérő affinitásuk van. Egy másik magyarázat lehet, hogy a peptidek, a baktériumok által termelt különféle proteázok degradáló hatásaival szemben mutatnak eltérő érzékenységet. Egy membrán impermeabilis, DNS interkaláló festék, a propidium-jodid (PI) felvétele NCR kezelt *S. meliloti* sejtek által arra utal, hogy a peptidek képesek megváltoztatni a baktérium membrán permeabilitását (Van de Velde, Zehirov mtsai. 2010), (Tiricz, Szucs mtsai. 2013). Továbbá az is bizonyított, hogy a rhizobium BacA fehérjéje szerepet játszik ezen membrán permeabilizáló és NCR ölő aktivitás csökkentésében, mivel a *S. meliloti* BacA-deficiens mutáns sokkal érzékenyebb volt az NCR247 *in vitro* illetve az NCR keverékek *in planta* antimikrobiális aktivitásával szemben, mint a vad típus (Haag 2011). A plazmidon kódolt vad típusú *S. meliloti* *bacA* génnel (pSmbacA) azonban sikerült helyreállítani a mutáns törzs életképességét valamint szimbiotikus fejlődését, megerősítve ezzel azt a tényt, hogy a *S. meliloti* NCR peptidekkel szembeni védelméhez mind *in vitro* mind *in planta* a BacA fehérje hozzájárul. A peptidkezelés hatására a PI fluoreszcencia is sokkal nagyobb mértékben megugrott a BacA- mutánsban a vad típushoz képest, ami megint csak azt igazolja, hogy a BacA fehérje kritikus a rhizobium gazda peptiddel szembeni hiperérzékenységeinek megakadályozásában (Haag, Baloban mtsai. 2011).

Kationos NCR peptidekkel kezelt *S. meliloti* baktérium kultúrák transzkriptom analízise illetve a peptidek bakteriális célpontjainak azonosítására irányuló biokémiai kísérletek jeleztek néhány lehetséges bakteriális célpontot, illetve mechanizmust, melyek fontosak lehetnek a peptidek szimbiotikus aktivitásában és antimikrobiális hatásában. Szabadon élő sejt kultúrák közel letális koncentrációjú peptidekkel történő kezelése olyan transzkripciós változásokat indukált, pl. az F₀F₁-ATPáz alegységeit, a riboszómális

fehérjéket, az RNS polimeráz alegységeket, transzkripció és transzláció elongációs faktorokat kódoló gének expressziójának gátlása, stressz-fehérjéket és transzkripció faktorokat, transzportereket kódoló gének indukciója, amelyek arra utalnak, hogy a peptidek hatására a sejtek elvesztik membrán potenciáljukat (Tiricz, Szucs mtsai. 2013). Ezzel szemben, amikor szinkronizált sejteket kezeltek alacsony koncentrációjú peptidekkel, a sejtciklus regulátorokat és fehérjéket kódoló gének expressziója csökkent le, ami a sejtciklus gátlásához és endoreduplikációhoz vezetett (Penterman, Abo mtsai. 2014). Biokémiai kísérletek azt mutatták, hogy az NCR247 peptid többféle mechanizmussal járul hozzá a bakteroidok kialakulásához, s ugyanezen mechanizmusok hozzájárulhatnak antimikrobiális hatásához is (Farkas, Maroti mtsai. 2014). A peptid a riboszóma alegységekhez kötődve gátolja a transzlációt mind *in vitro* mind *in vivo* rendszerekben, míg a sejt osztódási síkjában történő FtsZ fehérje polimerizáció gátlásával a DNS-replikációt követő sejtosztódást akadályozza meg. Emellett a GroEL chaperonhoz történő kötődése tovább módosíthatja, felerősítheti az általa indukált folyamatokat.

Tehát az egyes kationos NCR-ek ugyan eltérő hatásspektrummal rendelkeznek, de összességében véve a Gram-pozitív és Gram-negatív humán/állat és növénypatogén baktériumoknak egy széles skáláját képesek gátolni, így potenciális jelöltek lehetnek mind a humán és állategészségügy, mind pedig a növényvédelem és az élelmiszeripar számára, mint újgenerációs antibiotikumok.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A gombás fertőzések számának mértéktelen elszaporodása és a kezelésükre irányuló terápiát akadályozó antibiotikum rezisztencia jelensége arra készteti a kutatókat, hogy új, hatékony megoldásokat találjanak erre a problémakörre. A természetben fellelhető ágensek, mint amilyenek a növényi antimikrobiális peptidok is, alkalmas megoldásként szolgálhatnak.

Korábbi kísérletek kimutatták, hogy egyes, magas izoelektromos ponttal rendelkező NCR peptidok antimikrobiális hatással rendelkeznek számos Gram-negatív és Gram-pozitív baktériummal szemben.

1. Ennek tükrében, első körben arra voltunk kíváncsiak, hogy az NCR-ek hatékonyak lehetnek-e gombákkal szemben is.
2. A továbbiakban célunk volt annak kiderítése, hogy a vizsgált, antifungális aktivitással rendelkező NCR peptidok milyen mechanizmussal fejtik ki hatásukat élesztőszerűen növekvő gombákon, mely sejtalkotók illetve fehérjék a célpontjaik.
 - a. Ennek érdekében, vizsgálni akartuk az NCR peptidok esetleges gombamembránt károsító hatását.
 - b. Meg akartuk határozni az NCR peptidok lokalizációját a célsejten.
 - c. Megpróbáltuk azonosítani az NCR peptidokkal kölcsönható fehérjepartnereket.
3. Végző célunk pedig annak megállapítása, hogy az NCR peptidok alkalmazhatók-e terápiás célra, melynek előfeltétele, hogy ne legyenek toxikusak emlős/humán sejtekre, s képesek legyenek *in vitro* és *in vivo* leküzdeni a gombás fertőzést.

Ez utóbbi két pont (2., 3.) megvalósításához célorganizmusnak a *Candida albicans*-t választottuk, mely az egyik leggyakoribb oportunista humán patogén gomba.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 A vizsgálatokban szereplő mikroorganizmusok

Ascomycota- tömlős gombák törzse:

Hemiascomycetes osztály:

1. *Candida albicans*
 - a. WO1
 - b. Sc5314
2. *Candida krusei* (CBS 573)
3. *Candida parapsilosis* (CBS 604)
4. *Canida glabrata*

Eurotiomycetes osztály:

1. *Trichophyton mentagrophytes* (klinikai izolátum)
2. *Aspergillus niger* (CBS 120.49)
3. *Aspergillus flavus* (2324)

Sordariomycetes osztály:

1. *Fusarium graminearum* (11030)

Basidiomycota- bazídiumos gombák törzse:

Exobasidiomycetes osztály:

1. *Malassezia furfur* (DSMZ6170)

Zygomycota- járomspórás gombák törzse:

Zygomycetes osztály:

1. *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* (13603)

3.2 Alkalmazott táptalajok, tápoldatok, tenyésztési körülmények

A *Candida* fajokat YPD táptalajon (10 g/l élesztőkivonat, 20 g/l bacto peptone, 20 g/l dextróz, 2 % agar) tartottuk fenn. A *Malassezia furfur*-t Pityrosporum médiumon (DSMZ472: 40 g/l maláta-kivonat, 20 g/l szárított ökör epe, 10 g/l Tween 40, 2,5 g/l glicerin, 15 g/l agar) növesztettük. A *T. mentagrophytes* Sabouraud agaron (Fluka), míg a többi fonalas gomba, így az *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum* és a *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* malátás táptalajon (malt extract agar, MEA: 0,5 % maláta-kivonat, 0,5 % élesztőkivonat, 0,5 % glükóz, 1 % KH_2PO_4 , 2 % agar) volt fenntartva. *C.albicans*-on hifás növekedést szérummentes komplett keratinocita médiummal (Complete Keratinocyte Medium, CKM; Life Technologies) indukáltunk.

Az NCR peptidekkel végzett érzékenységi vizsgálatokat az alacsony só koncentrációjú, a defenzinek antifungális hatásának tanulmányozására használt táptalajban (low-salt medium, LSM: 5 mM K_2HPO_4 , 100 μM MgSO_4 , 10 μM FeCl_3 , 0,2 μM CoCl_2 , 0,2 μM CuSO_4 , 4 μM Na_2MoO_4 , 1 μM H_3BO_3 , 0,2 μM KI , 1 μM ZnSO_4 , 0,2 μM MnSO_4 , 20 g/l glükóz, 2 g/l aszparagin, 40 mg/l methionin, 4 mg/l myo-inositol, 0,4 mg/l biotin, 2 mg/l thiamine-HCl and 0,4 mg/l pyridoxine-HCl) (Spelbrink, Dilmac mtsai. 2004), illetve egy glükózos foszfát pufferben (PBgluc: 1 mM KH_2PO_4 , 3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 5% glükóz, pH=7.0) végeztük.

3.3 A vizsgálatokban szereplő humán sejtvonal

A PK E6/E7 immortalizált human vaginális epitél sejt vonalat (Rajan, Pruden mtsai. 2000) 5 ng/ml rekombináns epidermális növekedési faktorról, 50 $\mu\text{g/ml}$ marha agyalapi mirigy kivonattal, L-glutaminnal és antibiotikum/antimikotikum oldattal kiegészített szérum mentes CKM-ben (Life Technologies) tartottuk fenn, 37 °C-os CO_2 termosztátban (Pivarcsi, Nagy mtsai. 2005). A sejtnövesztő flaskákban 60-70% konfluenciát mutató sejteket használtuk fel a kísérletekhez.

3.4 Alkalmazott peptidek

Kémiai úton szintetizált érett, szignál peptid nélküli, valamint N-terminálisán fluorescein isothiocyánnal (FITC) jelölt NCR peptideket (1. Táblázat) használtunk (>95% tisztaságú, Proteogenix), melyeket MilliQ vízben oldottunk fel.

PEPTID	ÉRETT PEPTID SZEKVENCIÁJA	HOSSZ	MW	pI
NCR168	YPFQECKVDADCPTVCTLPGPCDICSFPDVPTCIDNNCFCT	41	4476	3,61
NCR095	ELVCDTDDDCLKFFPDNPYPMECINSICLSLTD	33	3770	3,62
NCR051	EEDIGGHLECEVEDECMEESCPIFSVHKCKNSGCECEMFR	41	4684	4,14
NCR235	DTDPFAFCIKDSNCGQDLCTSPNEVPECRLKQCQIKS	38	4223	4,53
NCR224	KDLPFNICEKDEDCLEFCAHDKVAKCMLNICFCF	34	3987	4,65
NCR001	AFERTETRMILTIPCTSDANCPKVISPCHTKCFDGFSGWYIEGSYEGP	47	5263	5,01
NCR084	FATGMPCKTDKECPNTSTHKYKCINDDCFCFYIWPLGNSLV	42	4856	6,71
NCR169	EDIGHIKYCGIVDDCYKSKKPLFKIWKCVENVCVLWYK	38	4565	8,45
NCR055	VNDCIRIHCDDDFDCIENRLQVGCRQLQREKPRCVNLVCRCLRR	43	4759	9,21
NCR035	SFLGTFISSCKRDKDCPKLYGANFRCKRGTCVPPI	35	3910	9,42
NCR192	MKNGCKHTGHCPRKMCGAKTTKCRNNKCQCQVQL	33	3708	9,54
NCR137	MTLRPCLTDKDCPRMPPHNIKCRKGHCVPKIGKPFK	35	4018	9,70
NCR147	IYFPVSRPCITDKDCPNMKHYKAKCRKGFCISSRVR	36	4249	9,76
NCR280	MRVLCGRDGRCPKFCMCRTFL	20	2390	9,80
NCR183	ITISNSSFGRIVYWNCCTDKDCKQHRGFNFCRSGNCIPIRR	42	4979	10,10
NCR247	RNGCIVDPRCPYQQCRRPLYCRRR	24	3009	10,15
NCR044	AFIQLSKPCISDKECSIVKNYRARCRCRGYCVRRRIR	36	4318	10,32
NCR030	AFLPTRNCITNKDCRQVRNYIARCRKGQCLQSPVR	36	4197	10,37
NCR335	RLNTTFRPLNFKMLRFWQGNRNMKHRGQKVHFSLILSDCKTNKDCPKLRRANVRCRKSVCVPI	64	7736	11,22

1.Táblázat: az alkalmazott NCR peptidek listája növekvő izoelektromos pontjuk szerint rendezve.

3.5 Antifungális érzékenység vizsgálat

Az NCR peptidek *in vitro* antifungális aktivitását a felsorolt gombákkal szemben 96-lyukú sík aljú lemezben (Sarstedt) vizsgáltuk mikrohígításos módszerrel. A peptidekből 200, 100, 50 és 20 µg/ml koncentrációjú hígításokat készítettünk LSM táptalajban és minden lyukba 50 µl-t adtunk egy adott hígításból, valamint 50 µl LSM táptalajt, mely mililiterenként 10⁴ sejtet vagy spórát tartalmazott. Így a peptidek végkoncentrációi 100, 50, 25 és 10 µg/ml voltak. A lemezeket 30°C-on inkubáltuk. Az NCR peptidek hatását a spórák csírázására és az élesztő sejtek sarjadzására a kezelés megkezdését követően 24 és 48

órával mikroszkópos vizsgálatokkal, valamint a kultúrák növekedésének mérésével határoztuk meg. A növekedés mértékére a 600 nm-en történő abszorbananciából következtettünk, melyet egy FLUOstar OPTIMA mikrotiter lemez leolvasó készülékkel (BMG Labtech) mértünk meg. Spektrometriai kalibrációhoz 100 µl steril LSM tápoldatot használtunk. Növekedési kontrollként peptidet nem tartalmazó tápoldatot adtunk a spóra illetve sejt kultúrához. *C. albicans* esetében a minimális gátló (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) és minimális fungicid (Minimal Fungicid Concentration, MFC) koncentráció értékek meghatározásához 19 NCR peptidből felező hígítási sort készítettünk 100 és 1,56 µg/ml között. MIC értéknek azt a legalacsonyabb koncentrációt állapítottuk meg, ahol nem volt látható és mérhető növekedés 24 óra inkubációt követően. Annak eldöntésére, hogy az antifungális hatás csupán fungisztatikus, vagy fungicid volt-e, a 100 µl kezeléseket Eppendorf csőben mértük össze (10^5 sejt/ml koncentrációt alkalmazva) és 3 illetve 24 óra 30°C-os inkubáció után minden egyes kezelésből 10 µl-t szilárd YPD lemezre cseppentettünk ki, majd a lemezeket 48 órát inkubáltuk. MFC értéknek azt a koncentrációt definiáltuk, amelynél ennyi idő elteltével nem tapasztaltunk telep növekedést a YPD lemezen.

Az NCR peptidek fonalas gombák hifáinak növekedésére gyakorolt hatását az előzőekhez hasonlóan vizsgáltuk, azzal a kivétellel, hogy a gomba spórákat (*Rh. stolonifer*, *A. niger* és *A. flavus*) éjszakán át 100 µl LSM-ben előnövesztettük, majd a már hifázó formához adtuk az LSM-ben hígított peptideket azonos térfogatban. A hatást 24 órával a kezelést követően fénymikroszkóp segítségével figyeltük meg.

3.6 Peptidek szérum érzékenységének vizsgálata

50 µl, milliliterenként 10^4 *C. albicans* WO-1 sejtet tartalmazó PBgluc pufferhez 50 µl 100 µg/ml koncentrációjú NCR247 illetve NCR335 peptidet, valamint 0, 20, 40 és 80% FBS-t (Fetal Bovine Serum) tartalmazó PBgluc puffert adtunk. Három óra kezelést követően (30 °C-on) a sejteket szilárd YPD lemezre szélesztettük, majd 24 órát 30 °C-on tovább inkubáltuk.

3.7 Fluoreszcens és konfokális mikroszkópia

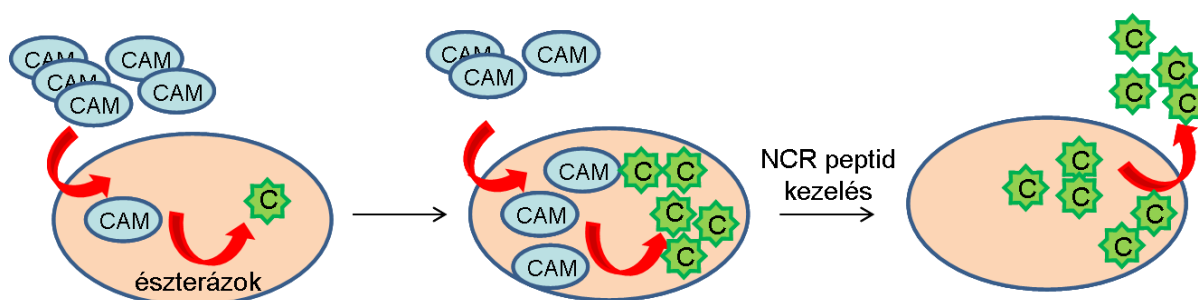
Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a peptidek hatását *C. albicans* fonalas alakján is, a gombasejteket szérum és antibiotikum/antimikotikum mentes CKM-ben indukáltuk pszeudohifás növekedésre. A sejteket 96-lyukú lemezben inkubáltuk 3 órát 30 °C-on a humán médiumban, majd lecseréltük a CKM-et LSM-ben hígított NCR-ekre. Két óra peptid kezelést követően 5 µg/ml FM4-64 membrán festékkel (Life Technologies) és 0.5 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) DNS festékkel jelöltük a sejteket 15 percig 30 °C-on tartva őket. Ezt követően egy Axio Observer Z.1 (Zeiss) fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk a morfológiai változásokat.

A peptid-gomba viszony (a peptid gombasejten kívüli vagy azon belüli elhelyezkedésének) tanulmányozáshoz éjszakán át növesztett *C. albicans* kultúrából 1000x-es hígítást készítettünk LSM-ben és FITC-konjugált peptidekkel kezeltük (a kationos NCR-t 5 µg/ml szubletális koncentrációban alkalmazva) 3 órán keresztül 30 °C-on. A sejteket ezután centrifugáltuk (4 perc 600 rpm), és ezt követően finom pipettázással eltávolítottuk a nem kötődött felesleges peptideket és friss LSM-ben szuszpendáltuk fel a leülepedett sejteket. Az így elkészült sejtsuszpenziót fedőlemezre cseppentettük és Olympus Fluoview FV1000 konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal (Olympus) készítettünk felvételeket.

3.8 Sejtpermeabilitás vizsgálat

A sejt permeabilitást az intracellulárisan felhalmozódott festék, a calcein sejtből történő felszabadulásának mérésével monitoroztuk (6. ábra). Éjszakán át növesztett *C. albicans* sejteket kétszer mostuk 10 mM kálium-foszfát pufferrel (pH=7,0), majd ugyanebben felsuszpendáltuk 10^7 sejt/ml koncentrációban. A sejteket feltöltöttük acetomethoxy-calceinnel oly módon, hogy 2 órán keresztül kezeltük őket 5 µM végkoncentrációjú oldattal szobahőmérsékleten. Ezt követően a sejteket háromszor mostuk, hogy a felesleges, fel nem vett festéket eltávolítsuk, majd 100-100µl sejtsuszpenziót pipettáztunk 96-lyukú FIA fekete lemezek lyukaiba. Az NCR-eket 50 µg/mL koncentrációban adtuk a sejtekhez. A sejtek észterázai által az acetomethoxy-calceinből képződött calcein felszabadulását fluoreszcenciája intenzitásának mérésével detektáltuk mikrotiter lemez leolvasó készülékkel (FLUOstar OPTIMA; BMG Labtech)

485 nm-es excitáció és 530 nm-es emisszió mellett. A kiáramlott calcein mennyiségét százalékban adtuk meg, amit a következő egyenlettel számoltunk: $[(Ir - Iháttér)/(Iint - Iháttér)] \times 100$, ahol *Ir* az NCR kezelt mintákból felszabaduló (release) calcein 5 percnként mért fluoreszcencia intenzitása, *Iháttér* a háttér fluoreszcencia intenzitás, és *Iint* pedig a maximálisan elérhető intracelluláris calcein fluoreszcenciájának intenzitása, melyet 100%-nak vettünk (Vylkova, Nayyar mtsai. 2007). Ez utóbbit a sejtek 10 percig tartó előzetes forralásával kaptuk, a háttér intenzitást pedig a kezeletlen sejtekből felszabaduló calcein mérésével.



6. ábra: A sejt-permeábilis, nem-fluoreszcens Calcein-acetoximetil (Calcein-AM) festék az élő sejtekben intracelluláris észterázok hatására az acetoximetil észter hidrolízisét követően calceinné alakul, mely erős zöld-fluoreszcens jelet ad. A calcein hidrofil, így impermeábilis a sejt membránra és csak valamilyen membrán permeabilizáló ágens hatására tud felszabadulni a citoszolból. CAM: Calcein-AM; C: Calcein

3.9 Affinitás kromatográfiai vizsgálatok *C. albicans* fehérje preparátumokon

Affinitás kromatográfiát alkalmaztunk a kationos NCR247 intracelluláris célpont molekuláinak kutatásához. Első körben teljes sejtlyizátumot használtunk. Ehhez, 40 ml éjszakán át növesztett *C. albicans* kultúrát 4000 rpm-mel centrifugáltunk 12 percig, a felülúszó eltávolítása után a sejteket 10 ml LSM-ben vettük fel. A sejtek feltárásához a szuszpenziót French Press (Glen Mills, Model 11) készülék nagy pisztonján engedték át négyszer egymás után ~18000 psi nyomáson. Az így kapott sejtlyizátumot 15000 rpm-mel fugáltuk 4 °C-on 15 percig. A továbbiakban a felülúszót használtuk, amit 4 mg/ml koncentrációra kihígítottunk. A fehérje extraktumból 3-3 ml-t 15 ml-es centrifuga csövekbe tettünk és 10 µg/ml végkoncentrációjú, a C-terminális végén Strep antigént hordozó NCR 247-tel, valamint kontrollként nyolc aminosav hosszúságú Strep peptiddel kezeltük 2 órán át szobahőn. Az inkubációt követően a kezelt extraktumot előzetesen Strep-Tactin ággal töltött oszlopra (IBA, Göttingen) vittük fel és egy órát forgattuk 4 °C-

on, majd átfolyattuk az oszlopon, 7-szer mostuk a gyártó által biztosított pufferrel, végül pedig a felkötődött peptidet és a kölcsönható partnereket eluáló oldattal mostuk le. A mintákban levő fehérjéket 10% SDS-PAGE (illetve 4-12 % NuPAGE) segítségével választottuk el és futás után ezüst-nitráttal festettük meg. Az egyes csíkokban levő fehérjéket a gélből történő kivágást követően az MTA SZBK Proteomikai Laborja LC-MS/MS tömegspektrometriai analízis segítségével azonosította. Pozitív eredményként azokat az esetleges interakciós partnereket kezeltük, melyek csak az NCR247Strep mintában fordultak elő, és a Strep peptiddel kezelt mintából nem azonosítottuk.

Csak plazmamembránt tartalmazó izolátummal is végeztünk lehúzási (pull-down) kísérleteket. Ehhez az élesztő membrán tisztítását *C. albicans* WO-1 sejtekből a Methods in Molecular Biology-ban található élesztő protokollok egyike alapján végeztük a következő módosításokkal. 250 ml éjszakán át növesztett sejt kultúrát 15 percig centrifugáltunk 3500 rpm-mel, majd a leülepedett sejteket 20 ml 0,4M szacharózt tartalmazó A pufferben (25mM imidazol, pH=7, 1:100 arányban tartalmaz proteáz inhibitor (Roche, Complete EDTA-free, 1 tabletta 1ml vízben oldva)) szuszpendáltuk fel. Ezt követően a sejteket 3500 rpm-en történő centrifugálással összegyűjtöttük, majd 425-600µm átmérőjű üveggyöngyöket (Sigma) adtunk hozzájuk kétszeres térfogat mennyiségben, és annyi szacharóz A puffert, amennyi éppen ellepte a sejteket és az üveggyöngyöket. Két percig vortexeltük a keveréket, amit 30 másodperc jégen történő hűtés követett. Ezt a lépést még kétszer ismételtük meg, majd szacharóz A pufferben háromszorosára hígítottuk a mintát. 20 perc centrifugálással (2500 rpm) üleptítettük a fel nem tárt sejteket és az üveggyöngyöket. A felülúszót újra centrifugáltuk 30 percig 15000 rpm-mel, és az így kapott pellet tartalmazta a protokoll szerint a membrán frakciót, amit kálium-foszfát pufferben vettünk fel. A továbbiakban az így kapott membrán izolátumot (2,4mg/ml) kezeltük 10 µg/ml végkoncentrációjú NCR247Strep és Strep peptidekkel.

3.10 Feltételezett kölcsönható partnerek vizsgálata élesztő kettős-hibrid módszerrel

A kiválasztott géneket (transzlációs elongációs faktor 3, *CEF3*; transzlációs elongációs faktor 2, *EFT2*; eukarióta iníciációs faktor 4A, *eifA4*; hősokk protein, *hsp*) *Pfu* DNS polimerázzal (Thermo Scientific) amplifikáltuk előzetesen *C. albicans* WO-1 sejtekből élesztőre specifikus SOLEX Genomic DNA Isolation kit-tel (IZOTÓP Intézet

Kft) tisztított genomi DNS-ről. A felhasznált primerek (melyek tartalmazták a gének klónozásához szükséges restrikciós hasító helyeket) a következők voltak:

CEF3_BamHI_Fw: 5'-GGGGATCCTGTCTGCTAGTGAATCCAAATATTC-3'

CEF3_XhoI_Rev: 5'-CGCGCGCGGCTCGAGTTAGAATTCTTCATCAGATGAGACATAAG-3'

EFT2BamHi_Fw: 5'-GGGGATCCTGGACAAGGTCACCAATGTCCGTAAC-3'

EFT2Xhoi_Rev: 5'-GGGCGCGCTCGAGTTACAATTTATCGTAATATTCAGTGTATTC-3'

hspBamHi_Fw: 5'-GCCGGGGATCCTGTCTAAAGCTGTTGGTATTGATTTAG-3'

hspXhoi_Rev: 5'-CTCGAGGGGCGCTAATCAACTTCTTCAACAGTTGGACCATCGTTAG-3'

eifA4BamHi_Fw: 5'-GGGGATCCTGGCATCCGAAGGTATTACTGAAATCG-3'

eifA4Xhoi_Rev: 5'-GCGCCGGGCTCGAGCTAAGCGAATAAAGCACCAATAT-3'

A PCR termékeket megfelelő restrikciós enzimmal való hasítást követően, klónoztuk BamHI és XhoI enzimekkel emésztett pGADT7 préda vektorba. A csali vektorkonstrukciót, amely az NCR247-et, mint csali peptidet kódoló gént hordozza (pBDGal4::NCR247) a csoportban már korábban előállították. A DNS mintákat 100 ng/μl-re hígítottuk és ebben a koncentrációban használtuk fel. A csali és préda vektorkonstrukciókat *AH109* (MATa, trp 1–901, leu2-3, 112, ura3-52, his3- 200, Δgal4, Δgal80, LYS2: GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS- GAL2TATA-ADE2, URA3: MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ; James 1996) auxotróf élesztő törzsbe kotranszformáltuk (nem publikált saját módszer alapján). Végül négy féle szelekciós táptalajra cseppentettük ki transzformálás után az élesztőket: az SD-LT táptalajon ellenőrizhető, hogy sikeres volt-e a kotranszformálás, azaz mindkét klón bejutott-e a sejtekbe; SD-LTH médiumon kimutathatóak a gyenge kölcsönhatások; 3-amino triazol tartalmú SD-LTH táptalajon kisselektálhatóak a fals-pozitív fehérje kölcsönhatások, ha a rendszer leaky („löttyögő”); SD-LTHA táptalajon csak az erős kölcsönhatók nőnek. A transzformációt akkor tekintettük hatékonynak, ha a transzformálás után SD-LT lemezre a tömény mintából 30 μl-t kiszélesztve legalább 300 telepet számláltunk.

3.11 RNS tisztítás *C. albicans* sejtekből

Éjszakán át növesztett *C. albicans* WO-1 kultúrát LSM-mel mostuk egyszer, majd ugyanebben tízszeresére hígítottuk. A tízszeresére hígított kultúrából 1-1-ml-t 6-lyukú lemezre kiraktunk és 24 órát inkubáltuk 30 °C-on (biofilm képződés). Másnap leszívtuk a médiumot a sejtekről és LSM-ben hígított 10 µg/ml NCR 247-et, kontrollként pedig 1,88 µg/ml amfotericin B-t, illetve antifungális szert nem tartalmazó LSM-et adtunk hozzájuk és további 24 órára visszatettük a lemezeket 30 °C-ra. RNS tisztításhoz eltávolítottuk a felülúszót a sejtekről és 400-400 µl AE pufferben (50mM Nátrium-acetát, 10mM EDTA) szuszpendáltuk őket. 40 µl 10%-os SDS-t adtunk hozzá, majd vortexeltük, ezután 440 µl fenolt adtunk és ismét vortexeltük. A keveréket 65 °C-on inkubáltuk 5 percig, majd 2 percig centrifugáltuk (13000 rpm). A felső vizes fázishoz vele egyenlő térfogatú fenol/kloroform 1:1 arányú elegyét adtuk, jól összeráztuk és 2 percig centrifugáltuk (13000 rpm). Ezt a lépést még egyszer megismételtük és végül a felső fázist új csőbe átraktuk majd 0.1 térfogat 3 M nátriumacetát és 2.5 térfogat etanol adásával kicsaptuk az RNS-t. A preparátumból a maradék genomi DNS-t RNáz-mentes DNáz I enzimmal (Life Technologies) távolítottuk el a gyártó instrukciói szerint. A kísérletet háromszor ismételtük meg és mindhárom mintából két-két technikai párhuzamos volt minden alkalommal.

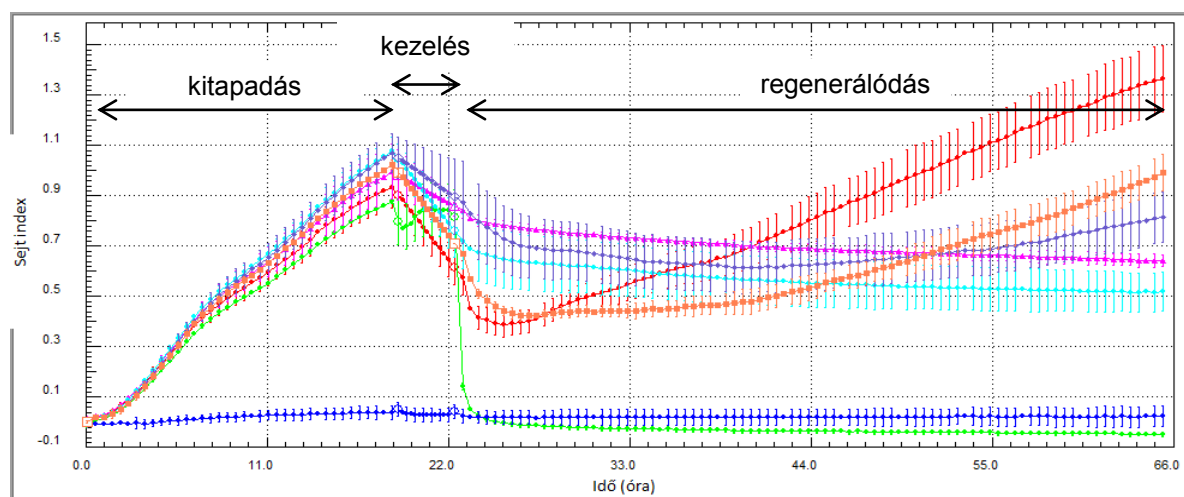
3.12 Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)

qRT-PCR-hez a fent említett RNS mintákból cDNS-t írtunk SuperScript VILO cDNA Kit (Life Technologies) segítségével. Az RT-PCR reakcióhoz SYBR Master mixet (Life Technologies) készítettünk és a következő primer párokat használtuk fel: 18S (F: 5'-AACCCGTTGAACCCCAT-3'; R: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3') és PIL1 (F: 5'-TAAGCAATTGAGTGCTTGGG-3'; R: 5'-GGTTGGACAGAACCTTCGAT-3'). A PCR kondíciók pedig a következők voltak: denaturáció 95 °C-on 5 percig, majd 95 °C-on 15 másodpercig történő denaturáció és 60°C-on 30 másodpercig végbemenő elongáció 40 ciklusban. A képződő fluoreszcencia intenzitás mennyiségi meghatározására a StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies) saját programját használtuk. A vizsgált gén relatív mennyiségét a 18S riboszomális RNS mennyiségére normalizáltuk.

3.13 Citotoxicitási vizsgálatok

MTT próba: 100-100 μ l, 1×10^4 sejt/ ml sűrűségű PK E6/E7 vaginális epitel sejtet 96-lyukú lemez lyukaiba pipettáztunk. A sejtek kitapadását követően eltávolítottuk a CKM –et és a peptideket 100 μ l PBglükózban hígítva adtuk hozzájuk. Három óra 37 °C-os inkubáció után leszívtuk a peptidoldatot és a sejteket 24 órát hagytuk regenerálódni CKM-ben. Ezután 5 mg/ml 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide-ot (MTT) adtunk minden lyukba és a lemezt 4 órára visszatettük 37 °C-ra. Az élő sejtek mitokondriális szukcinát dehidrogenáz aktivitása során képződő formazán mennyiségét mikrotiter lemez leolvasó készülékkel 560 nm-en mért abszorbancia segítségével határoztuk meg (Gyemant, Tanaka mtsai. 2005).

Valós idejű sejt analízis (Real-Time Cell Analysis, RTCA): 100-100 μ l, 7×10^4 sejt/ ml sűrűségű PK E6/E7 sejtet vittünk 96-lyukú E-lemez (ACEA Biosciences) lyukaiba, melyek alja mikro elektródokkal fedett. A sejteket 20 órán keresztül hagytuk kitapadni a lukak aljának felszínéhez. Ezután eltávolítottuk a CKM-et és a sejteket 100-100 μ l PBglükózban hígított peptiddel kezeltük. Három óra 37 °C –os inkubációt követően a peptidszuszpenziót 200 μ l friss CKM-re cseréltük. A sejtek szaporodása révén bekövetkező impedanciaváltozást 30 percenként mértük az xCELLigence System RTCA készülékkel (ACEA Biosciences) 72 órán keresztül (7. ábra).



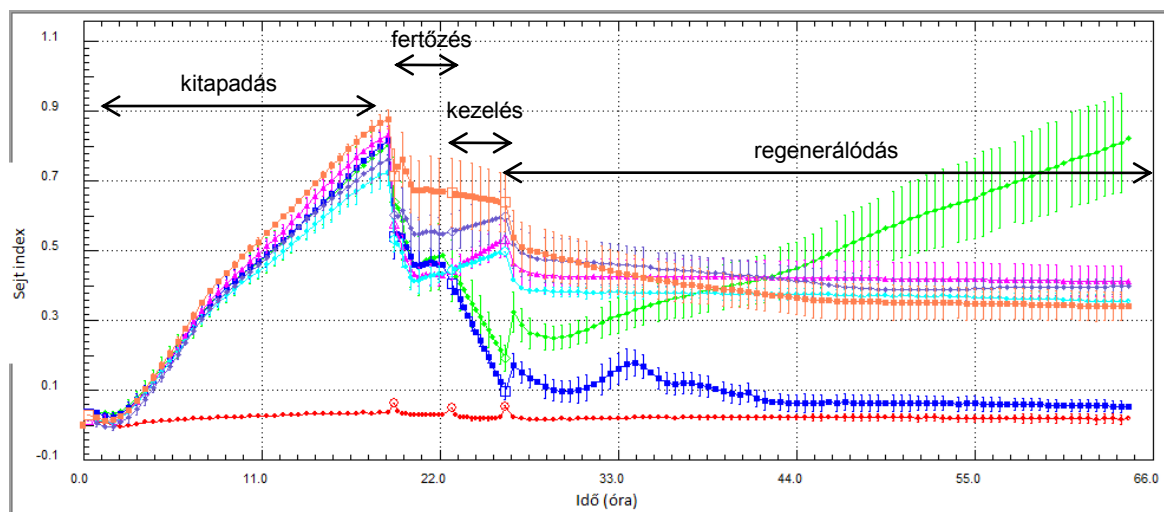
7. ábra: Sejt index görbe RTCA –val mért ellenállás értékek alapján. Piros: kezeltetlen kontrol; narancs: 12,5 μ g/ml peptid; lila: 25 μ g/ml; világos kék: 50 μ g/ml; rózsaszín: 100 μ g/ml; sötét kék: sejtmentes CKM; zöld: 10 μ g/ml primycin. A grafikon egy reprezentatív mérés eredményeit mutatja, melyet NCR247 peptiddel végeztünk.

Mindkét citotoxicitási próbánál 10 µg/ml primycint használtunk kontrollként. Ez egy makrolid lakton antibiotikum komplex (Horvath, Kramer mtsai. 1979), ami tapasztalataink alapján gyorsan öli a PK sejteket.

A vizsgálatokat két biológiai és egyenként négy technikai párhuzamosban ismételtük meg.

3.14 NCR peptidek hatásának vizsgálata vaginális epitél sejt- *C. albicans* kevert kultúrán

Éjszakán át növesztett *C. albicans* kultúrát kihígítottunk OD₆₀₀=1 sűrűségűre, majd hagytuk még nőni OD₆₀₀=1,5-2 sűrűségig, végül a kultúrát antibiotikum/antimikotikum mentes CKM-ben hígítottuk. A PK E6/E7 sejteket az RTCA módszernél leírtak szerint E-lemezekben növesztettük 20 órán keresztül, majd a humán sejtekhez adtuk a hígított gomba kultúrát, oly módon, hogy a fertőző ágens és a fertőzött sejtek aránya 5:1 (multiplicity of infection, MOI=5) volt (8. ábra). Három óra 37 °C-on történő inkubációt követően a ko-kultúráról lecseréltük a CKM-et PBglükózban hígított NCR-ekre. A kezelés újabb három óra hosszáig tartott, majd eltávolítottuk a peptideket és 200 µl friss antibiotikum/antimikotikum mentes CKM-et adtunk a sejteknek. A továbbiakban az ellenállás mérése a fentebb említettekkel azonos módon történt.



8. ábra: Sejt index görbe RTCA –val mért ellenállás értékek alapján. Zöld: kezeltlen, nem fertőzött kontrol; rózsaszín: nem fertőzött, 50 µg/ml peptiddel kezelt; lila: fertőzött, 50 µg/ml peptiddel kezelt; világos kék: nem fertőzött, 25 µg/ml peptiddel kezelt; narancs: fertőzött, 25 µg/ml

peptiddel kezelt; sötét kék: fertőzött kontrol; piros: sejt mentes CKM. A grafikon egy reprezentatív mérés eredményeit mutatja, melyet NCR335 peptiddel végeztünk

A fénymikroszkópos vizsgálathoz a PK sejteket az xCELLigence rendszerénél alkalmazott körülményekkel megegyezően növesztettük és kezeltük, azzal a különbséggel, hogy sima 96-lyukú lemezeket használtunk. A felvételek 24 órával a peptidkezelést követően készültek.

A vizsgálatokat két biológiai és egyenként négy technikai párhuzamosban ismételtük meg.

Statisztikai elemzés

A bemutatott eredmények mind átlag értékek, a hozzájuk tartozó matematikai/normális szórással. Szignifikanciát a Newman-Keuls tesztel számoltunk, a Windows kompatibilis GraphPad Prism 5-ös verzióját felhasználva. A 0,05-nél alacsonyabb valószínűségi (probability), p-értéket vettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. NCR peptidek antifungális hatása élesztőszerűen növő és fonalas gombákkal szemben

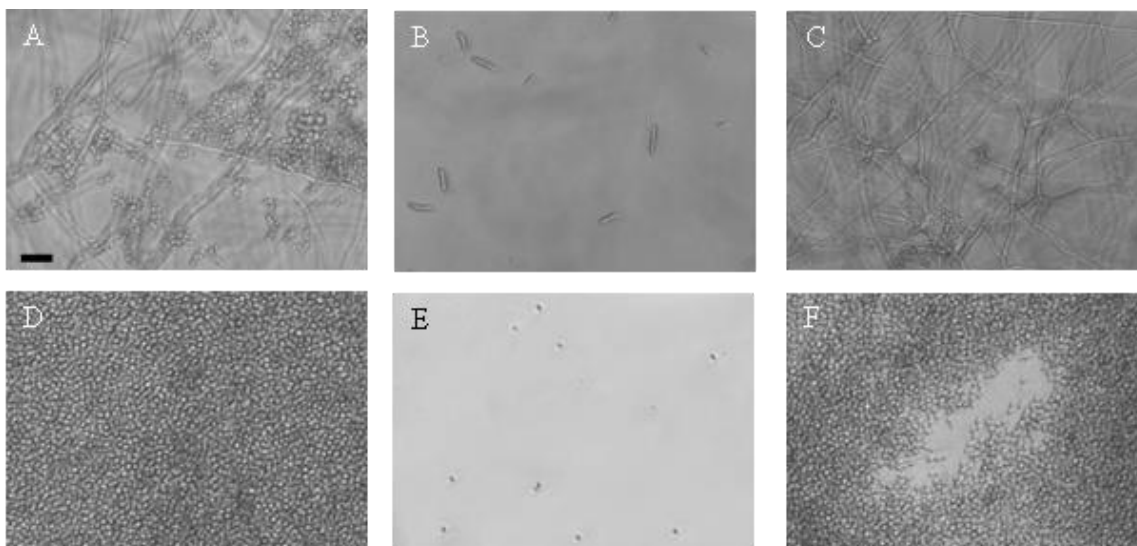
Az a tény, hogy az NCR peptidek emlékeztetnek a defenzinekre, arra készítette csoportunkat, hogy megvizsgáljuk a peptidek antimikrobiális hatását. Korábban kimutattuk, hogy kationos NCR peptidek számos Gram-pozitív és Gram-negatív baktériummal szemben antibakteriális aktivitással bírnak (Van de Velde, Zehirov mtsai. 2010), (Tiricz, Szucs mtsai. 2013). Figyelembe véve ezeket az eredményeket, érdemesnek találtuk megvizsgálni, hogy véletlenszerűen kiválasztott, az NCR család teljes izoelektromos pont spektrumát lefedő peptidek (1.Táblázat) rendelkeznek-e antifungális hatással néhány patogén gombafajjal szemben.

Az antifungális teszteket először az érzékenységi vizsgálatoknál általánosan használt szérum-mentes RPMI1640 tápoldatban (Sigma-Aldrich) végeztük el. Azonban ebben a médiumban a peptidek nem mutattak semmilyen növekedés gátló hatást, ami nem meglepő, tudván, hogy a benne lévő NaCl koncentráció (>100 mM) és a két értékű Ca^{2+} és Mg^{2+} ionok jelenléte gátolja az antimikrobiális peptidek aktivitását (Deslouches, Islam mtsai. 2005), (Maisetta, Di Luca mtsai. 2008), (Van de Velde, Zehirov mtsai. 2010). Ezért egy olyan, úgynevezett alacsony sótartalmú, „low-salt” médiumot (LSM) választottunk a peptid aktivitás vizsgálatához, melyben a növényi defenzinek bizonyítottan antifungális aktivitással rendelkeznek (Spelbrink, Dilmac mtsai. 2004). A kationos tulajdonságú növényi defenzinek antifungális aktivitását igazoló korábbi tanulmányokhoz hasonlóan (Thomma, Cammue mtsai. 2002), mi is azt tapasztaltuk, hogy a magas izoelektromos ponttal rendelkező, azaz a kationos NCR-ek antifungális aktivitást mutatnak számos gomba fajjal szemben (2. Táblázat). Tehát a kationos NCR-ek gátolták az élesztőszerűen növő *Candida* fajok és *Malassezia furfur* sarjadzását, valamint megakadályozták a fonalasan növő gombák spóráinak csírázását (9. Ábra).

	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida crusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Malassezia furfur</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
NCR168 (pI=3,61)	-	-	-	NV	NV	-	-	-	-	-
NCR095 (pI=3,62)	-	-	-	NV	-	-	-	-	-	-
NCR051 (pI=4,14)	-	NV	NV	NV	NV	-	NV	NV	NV	NV
NCR235 (pI=4,53)	-	NV	NV	NV	NV	-	NV	NV	NV	NV
NCR224 (pI=4,65)	-	NV	NV	NV	NV	-	NV	NV	NV	NV
NCR001 (pI=5,01)	-	NV	NV	-	NV	NV	NV	NV	NV	NV
NCR084 (pI=6,71)	-	NV	NV	NV	NV	-	NV	NV	NV	NV
NCR169 (pI=8,45)	+	NV	NV	NV	-	-	NV	NV	NV	NV
NCR055 (pI=9,21)	+++	+++	+++	NV	-	+++	-	+++	-	NV
NCR035 (pI=9,42)	-	+++	+++	NV	-	-	-	+	-	NV
NCR192 (pI=9,54)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	NV
NCR137 (pI=9,7)	+++	+++	+++	NV	+++	+++	-	+++	+++	+++
NCR147 (pI=9,76)	+++	+++	+++	NV	+++	+++	-	+++	+++	+++
NCR280 (pI=9,8)	+++	NV	NV	NV	NV	+++	NV	NV	NV	NV
NCR183 (pI=10,1)	+++	NV	NV	NV	NV	+++	NV	NV	NV	NV
NCR247 (pI=10,32)	+++	+++	++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++
NCR044 (pI=10,37)	+++	+++	++	NV	+++	+++	+	+++	+++	+++
NCR030 (pI=10,15)	+++	+++	+++	NV	+++	+++	++	+++	+++	+++
NCR335 (pI=11,22)	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

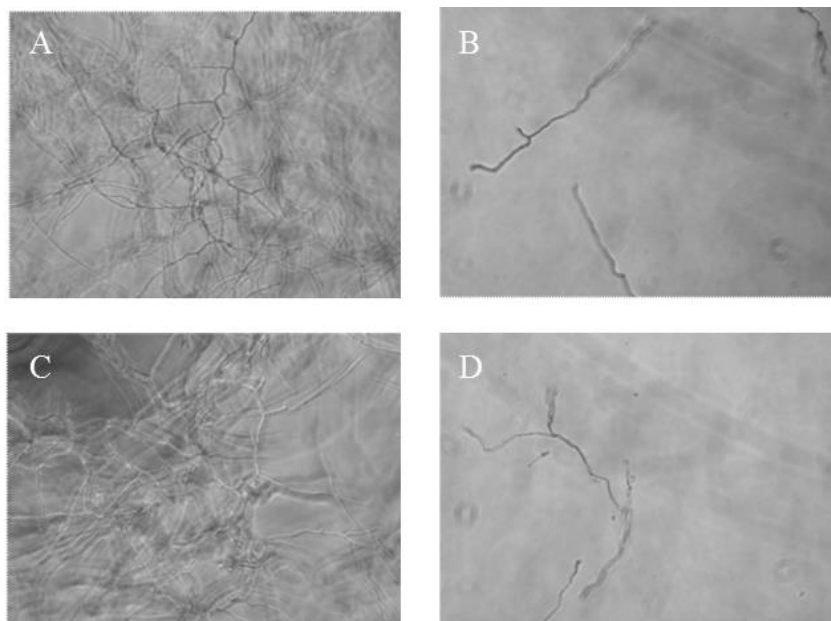
2.Táblázat: 19 eltérő izoelektromos ponttal rendelkező NCR peptid antifungális aktivitása különböző patogén gombafajokkal szemben. -: nem rendelkezik aktivitással; +: enyhe gátló hatás tapasztalható; +++: teljes növekedés gátlást eredményez; **NV**: nem vizsgáltuk.

Azok az NCR peptidek mutattak gátló hatást, melyek izoelektromos pontja nagyobb volt mint 9, ezzel szemben sem a kevésbé kationos illetve neutrális, sem az anionos peptidek nem mutattak antifungális aktivitást (9. ábra).



9. ábra: Különböző NCR peptid kezelések *in vitro* hatása fonalas és élesztőszerűen növekvő gombákra. **A-C:** *Tr. mentagrophytes*; **D-F:** *C. albicans*. **A,D:** Kezeletlen kontroll; **B:** 10 µg/ml NCR147 (IP=9,76); **C:** 100 µg/ml NCR51 (IP=4,14); **E:** 12,5 µg/ml NCR247 (IP=10,15); **F:** 100 µg/ml NCR084 (IP=6,71). Lépték: 20 µm.

A peptidek micélium növekedést gátló hatásainak vizsgálatához a fonalas gombákat először 16 órát előnövesztettük. A kezelést követően 24 óra múlva fénymikroszkópban megvizsgáltuk őket. A kationos peptidekkel (NCR192, NCR247, NCR335) kezelt gombák esetén azt tapasztaltuk, hogy a kezeletlen mintákhoz képest nem történt hifa növekedés. A fonalgombák esetében tehát a peptidek nem csak a spórák csírázását, de a gombamicélium továbbnövekedését is gátolják (10. ábra).



10. ábra: Egy kationos NCR peptid hifa növekedésre gyakorolt gátló hatása. Előnövesztett *A. niger* (A,B) és *A. flavus* (C, D) hifák 24 órával a peptidkezelés után (50 µg/ml NCR335) (B,D). A,C: kezeletlen kontroll.

4.2 NCR peptidek *C. albicans*-ra gyakorolt hatása

4.2.1 NCR-ek *C.albicans*-szal szembeni minimális gátló koncentrációinak és minimális fungicid koncentrációinak meghatározása

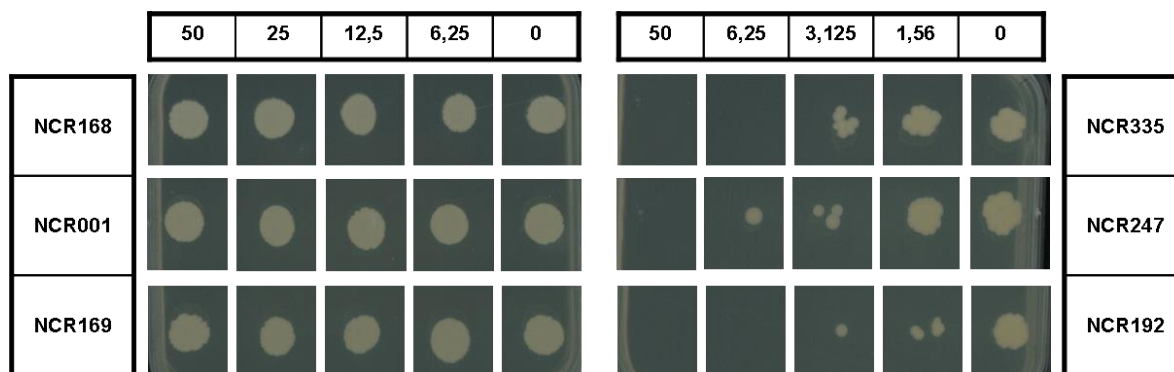
Miután megbizonyosodtunk, hogy egyes NCR peptidek antibakteriális tulajdonságain túl széles antifungális hatásspektrummal is rendelkeznek, vizsgálódásunkat leszűkítettük az egyik leggyakoribb humán patogén gomba fajra, a *Candida albicans*-ra. Mikrohígítási módszerrel meghatároztuk a peptidek minimális gátló koncentráció (MIC) értékeit a WO-1 és az Sc5314 laboratóriumi törzsekkel szemben (3. Táblázat). A MIC érték a legtöbb aktív NCR esetében ≤ 25 µg/ml volt, kivéve az NCR055-öt, ami 50 µg/ml koncentrációnál mutatott teljes növekedés gátlást, mindkét törzs esetében. Érdekes módon, az NCR035-nek, mely szintén magas izoelektromos pontú peptid, nem volt hatása *C.albicans*-ra.

	NCR168 (pI=3,61)	NCR095 (pI=3,62)	NCR051 (pI=4,14)	NCR235 (pI=4,53)	NCR224 (pI=4,65)	NCR001 (pI=5,01)	NCR084 (pI=6,71)	NCR169 (pI=8,45)	NCR055 (pI=9,21)	NCR035 (pI=9,42)
WO-1	-	-	-	-	-	-	-	-	50	-
Sc5314	-	-	-	-	-	-	-	-	50	-

	NCR192 (pI=9,54)	NCR137 (pI=9,7)	NCR147 (pI=9,76)	NCR280 (pI=9,8)	NCR183 (pI=10,1)	NCR247 (pI=10,15)	NCR044 (pI=10,32)	NCR030 (pI=10,37)	NCR335 (pI=11,22)
WO-1	10 (\pm 2)	20	19 (\pm 9)	19 (\pm 6)	19 (\pm 6)	14 (\pm 9)	11 (\pm 2)	15 (\pm 7)	11 (\pm 1)
Sc5314	12,5	25	12,5	25	12,5	25	12,5	25	12,5

3. Táblázat: NCR peptidek *in vitro* minimális gátló koncentrációja ($\mu\text{g/ml}$) *C.albicans* WO-1 és Sc5314 törzsekkel szemben.

Annak eldöntésére, hogy a kationos peptidek aktivitása csak növekedést gátló statikus, vagy ölő, cidikus-e a candidával szemben, 3 illetve 24 óra kezelést követően szilárd YPD lemezre cseppentettünk ki a sejtszuszpenzióból. Míg a kationos NCR peptidek gyors *in vitro* fungicid aktivitást mutattak (11. ábra, 4. Táblázat), az anionos peptidek esetében semmilyen gátló hatást nem tapasztaltunk (11. ábra).



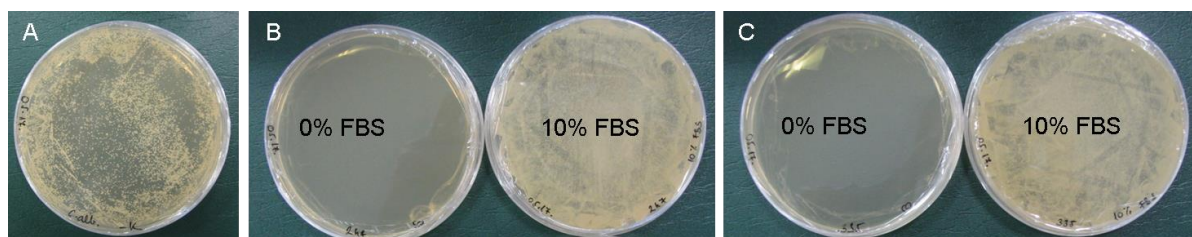
11. ábra: NCR peptidek fungicid aktivitása *C. albicans* sejteken. A folyadékkultúrák 3 óra peptid kezelést követően lettek kicseppentve szilárd YPD lemezre, amit 48 óra inkubáció követett 30 °C-on. Az anionos (NCR168, NCR001) és kevésbé kationos (NCR169) peptideknek nem volt hatása a gomba növekedésére. Ezzel ellentétben, a kationos peptidek (NCR335, NCR247, NCR192) fungicid hatást mutattak. A koncentráció értékek (felül) $\mu\text{g/ml}$ -ben értendők.

Az NCR-ek minimális fungicid koncentráció (MFC) értékei 6,25 és 25 $\mu\text{g/ml}$ között változtak (4. Táblázat).

	NCR192 (pI=9,54)	NCR137 (pI=9,7)	NCR147 (pI=9,76)	NCR280 (pI=9,8)	NCR183 (pI=10,1)	NCR247 (pI=10,15)	NCR044 (pI=10,32)	NCR030 (pI=10,37)	NCR335 (pI=11,22)
3h kezelés	8 (±3,5)	20	8(±6,5)	10 (±2)	16,5 (±12)	14 (±10)	11 (±2)	12,5	7 (±1)
24h kezelés	9 (±4)	25	9(±4)	8 (±3)	15,5(±13)	15,5 (±13)	6,25	16,25(±5)	8

4. Táblázat: Az aktív NCR peptidek minimális fungicid koncentrációja (µg/ml) *C.albicans* WO-1 törzzsel szemben 3 illetve 24 órás kezelés alapján.

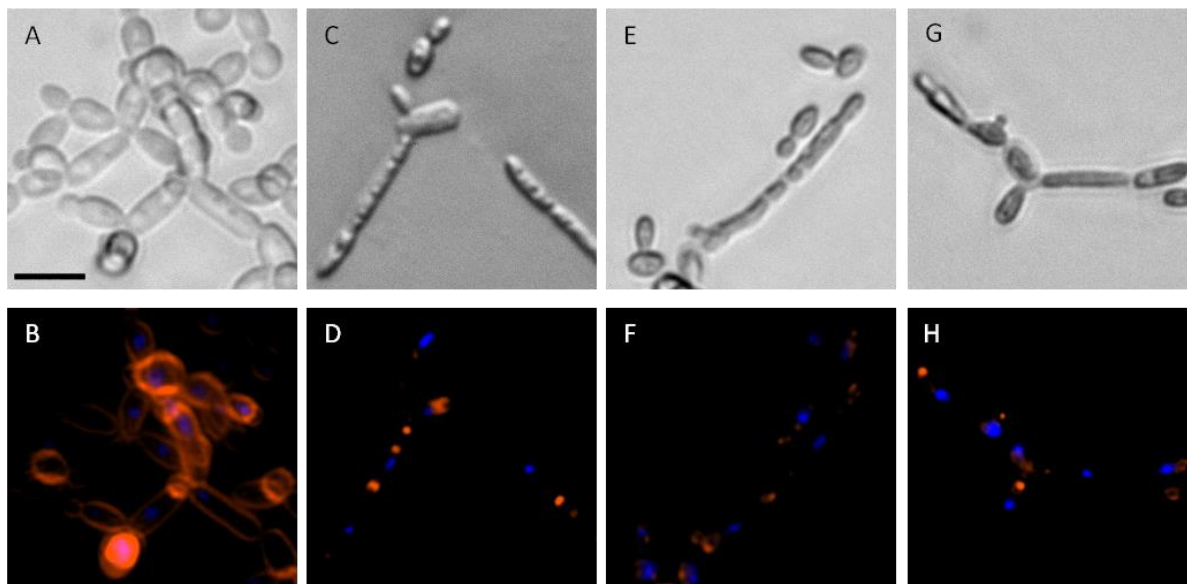
Általánosan elfogadott tény, hogy az élesztő-fonális forma közötti átalakulás képessége fontos virulencia faktor *C. albicans*-ban (Lo, Kohler mtsai. 1997). Ebből kiindulva, és látván, hogy peptidjeink hatékonyak több fonális gomba fajjal szemben is, megvizsgáltuk hogyan hatnak az NCR-ek a *C. albicans* pszeudohifáira. Számos tanulmány számolt be a *C.albicans* hifázó képességéről szérummal kiegészített humán médiumokban (Sudbery 2011), azonban szérum jelenlétében az NCR-ek aktivitása erősen gátlódott (12. ábra), hasonlóan más AMP-k aktivitásához (Maisetta, Di Luca mtsai. 2008). Bár azt tapasztaltuk, hogy komplett keratinocita médiumban (CKM) még szérum hiányában is megfigyelhető hifás növekedés, de a peptidek szérummentes CKM-ban sem voltak aktívak.



12. ábra: Szérum hatása kationos NCR peptidek antifungális aktivitására. **A:** kezeletlen *C.albicans*; **B:** kezelés 50 µg/ml NCR 247-tel; **C:** kezelés 50 µg/ml NCR 335-tel. FBS: főtális borjú szérum (fetal bovine serum).

Ezek ismeretében 3 órát szérummentes CKM-ban inkubálva a sejteket pszeudohifás növekedést indukáltunk, majd a humán médium eltávolítása után LSM-ben hígított NCR peptidekkel kezeltük a sejteket. Már két órával a kezelést követően a zsugorodott sejtméret egyértelmű morfológiai változásként volt megfigyelhető (13. ábra C, E, G), a membránfestődés szignifikáns csökkenése pedig membránkárosodásra utalt (13. ábra D, F, H). Ezen adatok alapján a kationos NCR-ek képesek a *C.albicans* hifás növekedését is

akadályozni és nyilvánvalóvá vált, hogy működésüket a célsejt membránjában bekövetkező súlyos szerkezeti változások kísérik.

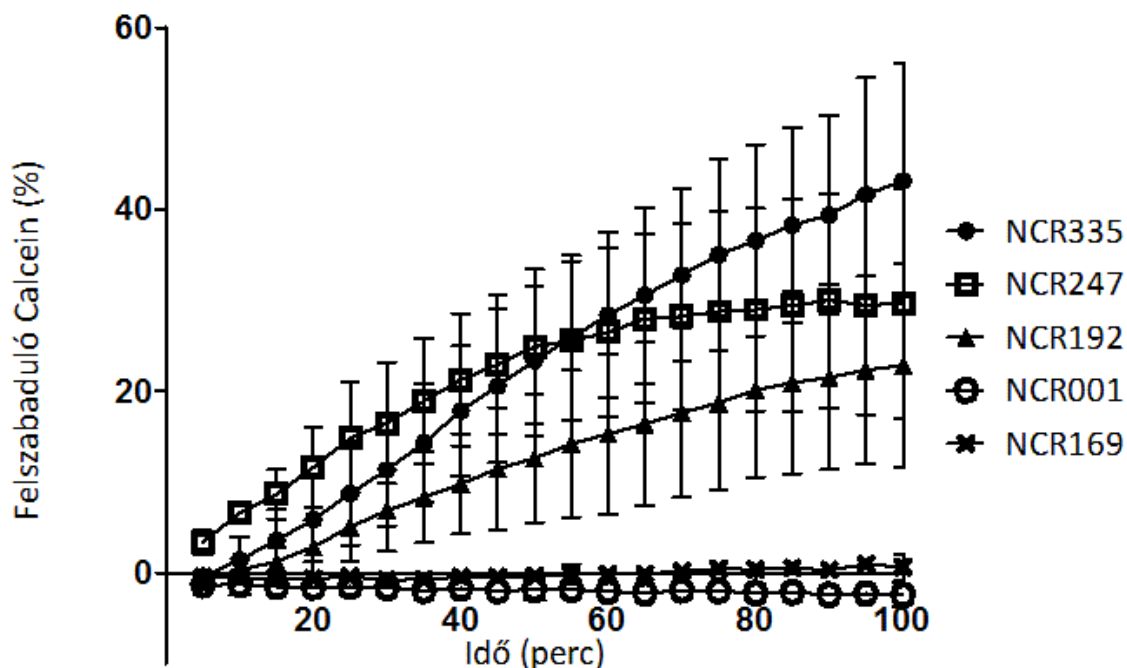


13. ábra: Kationos NCR peptidekkel történő kezelések hatására bekövetkező morfológiai változások *C. albicans* sejteken és pszeudohifákon. Hifázásnak indult *C. albicans* WO-1 sejtek 2 órás peptidkezelést követően. **C,D:** 25 µg/ml NCR335-tel; **E,F:** 25 µg/ml NCR247-tel; **G,H:** 25 µg/ml NCR192-vel kezelve. **A,B:** kezeletlen kontroll. **A, C, E, G:** DIC; **B, D, F, H:** FM4-64 (sejtmembrán: piros) és DAPI (DNS: kék) fluoreszcens jelölés. Lépték: 20 µm.

4.2.2 NCR peptidek *Candida* sejtmembrán permeabilizáló hatása

C. albicans sejtek kationos NCR kezelését követően redukált membránfestődés volt megfigyelhető. Ebből kiindulva megvizsgáltuk néhány NCR peptid membrán destabilizáló képességét. Ezt egy fluoreszcens festék, a calcein *Candida* sejtekből történő felszabadulásának detektálásával végeztük. (14. ábra).

Az előző kísérlet eredményeit alátámasztva, a kationos peptidek jelentős festékkiáramlást eredményeztek, míg a kevésbé kationos (mint az NCR169), illetve az anionos (NCR001) peptidekkel történő kezelés semmilyen festékfelszabadulást nem okozott. Különbség volt a kationos peptidek között is a kiváltott permeabilitás mértékében. A legmagasabb izoelektromos pontú NCR335-tel kezelt sejtekből csaknem kétszer annyi calcein szabadult fel, mint az NCR192-vel kezeltékből. Tehát az erősen kationos NCR-ek bizonyítottan képesek megbontani a gombamembrán integritását.



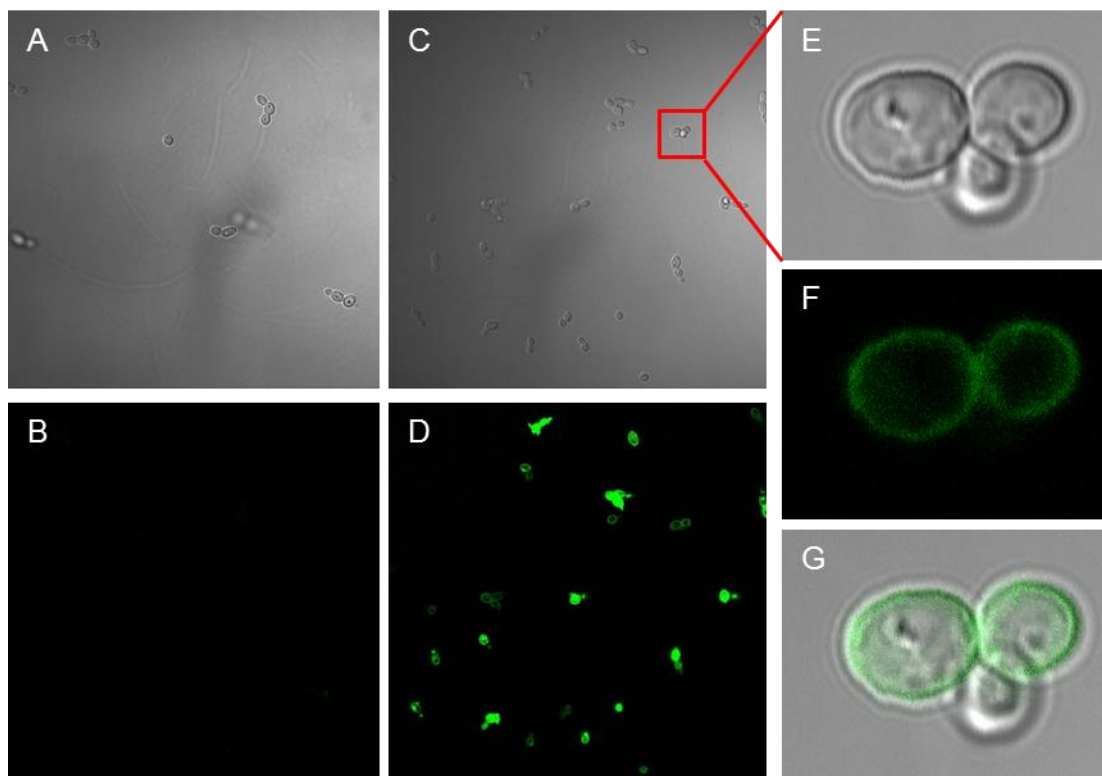
14. ábra: Calcein felszabadulás időfüggése NCR kezelt *C.albicans* WO-1 sejtekben.

4.2.3 NCR peptidek lokalizációja *C.albicans*-ban

A kationos peptidekre általánosan jellemző sejtmembrán károsító hatás van, hogy nem az elsődleges célja antimikrobiális aktivitásuknak, inkább csak egy utat biztosít a peptidek sejtbe történő bejuttatásához, ahol aztán DNS, RNS vagy fehérje szintézis gátlásával is kifejthetik tényleges hatásukat (Thomma, Cammue mtsai. 2002). Bár láttuk az NCR-ek membránkárosító hatását *C.albicans*-on, ez előbbi állításból kiindulva a peptidek pontos, sejten belüli lokalizációját itt is szerettük volna meghatározni. E célból a *C. albicans* sejteket FITC-konjugált NCR247-tel illetve NCR035-tel kezeltük majd konfokális mikroszkóppal a képződő fluoreszcencia helyét vizsgáltuk. Ezt megelőzően a FITC konjugált peptidek antifungális hatását leellenőriztük és a nem-konjugált peptidekhez hasonló koncentrációkban a FITC-jelölt NCR247 megőrizte candida ölő hatását, míg az NCR035-nek most sem volt aktivitása. Ahogy azt vártuk, NCR035 lokalizáció nem volt megfigyelhető a *C. albicans* sejtekben (15. ábra A, B), ami egybevág a peptid candida elleni aktivitásának hiányával (3. Táblázat). Ezzel ellentétben a szubletális koncentrációban (5 µg/ml) alkalmazott FITC-jelölt NCR247 elsődlegesen a gomba

sejtmembránba lokalizálódott, habár kisebb mértékben intracellulárisan is detektálható volt (15. ábra C-G).

Ezek alapján az eredmények alapján elmondható, hogy más növényi defenzinekhez hasonlóan a kationos NCR peptidek célpontja a gomba plazmamembrán lehet, ahol pórusokat képeznek és/vagy a membrán károsításával jutnak a célsejtbe.

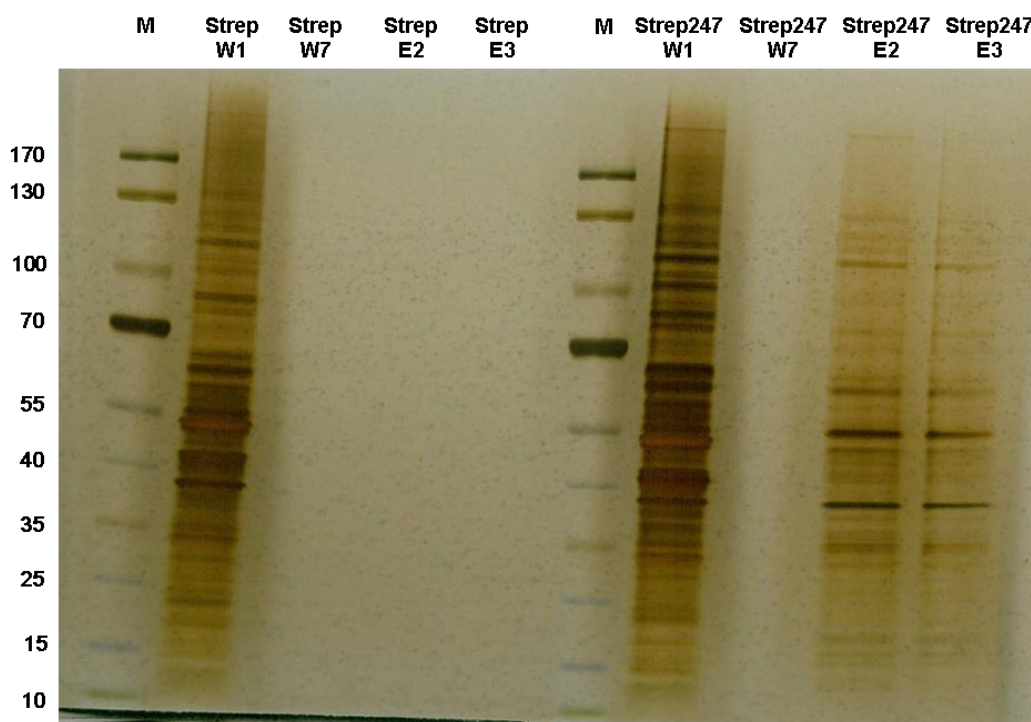


15. ábra: Fluoreszcensen jelölt NCR peptidek lokalizációja *C. albicans* WO-1 sejtekben. A sejtek 5 µg/ml FITC-konjugált NCR035-tel (A, B), illetve NCR247-tel (C-G) voltak kezelve. A peptidek lokalizációját konfokális mikroszkópiával figyeltük meg 3 órával a kezelést követően. A, C, E: DIC; B, D, F: fluoreszcens felvételek; G: E és F olvasztott képe. Lépték: 10µm

4.2.4 Az NCR peptidekkel kölcsönható *Candida* fehérjék azonosítása

Az NCR peptidek antifungális hatásmechanizmusának pontosabb megismeréséhez, a peptidek esetleges célpontjainak azonosításához affinitás kromatográfiát alkalmaztunk, melynek során egy kationos NCR peptidnek, az NCR247-nek kerestük a kölcsönható fehérjepartnereit *C. albicans* sejtekben. Első körben teljes sejtlyázumból indultunk ki. Az ebből nyert összfehérje kivonatból a Strep-tag-gel jelölt NCR247 peptid a pulldown-t

követő SDS-PAGE, majd az azt követő tömegspektrometriás analízis eredményei alapján nagyszámú molekulát kötött meg (16. ábra, 5. táblázat).



16. Ábra: SDS-poliakrilamid fehérje gélkép, mely a Strep peptiddel (Strep) és StrepNCR247 peptiddel kezelt *C. albicans* összfehérje kivonatból nyert mosó (W) és elúciós (E) frakciókat tartalmazza Strep-Tactin oszlopon történő kötést követően.

Ezek között legnagyobb számban riboszómális fehérjék szerepelnek, valamint a transzlációban szerepet játszó faktorok, mint például az eukarióta iniciációs faktor 4A, vagy a (magasabbrendű) gombákban egyedülállóan megtalálható transzlációs elongációs faktor 3. Érdekes módon a bakteriális fehérjepartnerek vizsgálata során is nagyszámú riboszómális fehérjét azonosítottak, mi több, kimutatták, hogy az NCR247 peptid gátolja a transzlációt mind *in vitro*, mind *in vivo* (Farkas, Maroti mtsai. 2014). A találatok valódiságának megerősítéséhez kiválasztottunk négy lehetséges kölcsönható partnert (táblázatban a bekeretezettek), melyek tényleges kölcsönhatását az NCR247-tel élesztő két-hibrid rendszerben ellenőriztük, azonban ezzel a módszerrel egyik kölcsönhatást sem sikerült megerősítenünk.

Acc #	Fehérje név
C5M1T7	40S ribosomal protein S6
G8BDI1	40S ribosomal protein S8
C5MHF6	40S ribosomal protein S25-B
B9WH22	Ribosomal protein, small subunit, putative
B9WMN3	Ribosomal protein, small subunit, putative
G8B521	Ribosomal protein
C5MG42	60S ribosomal protein L5
C5MFP2	60S acidic ribosomal protein P0
C4YEX3	60S ribosomal protein L13
C4YIE3	60S ribosomal protein L17
C4YNP1	60S ribosomal protein L18
B9WLA5	60s ribosomal protein, putative
B9WLL2	Ribosomal protein L15
B9WGF1	Ribosomal protein, large subunit, putative
B9WF28	18S ribosomal RNA biogenesis protein, putative
B9W6T1	Eukaryotic initiation factor 4A, putative
C4YJQ8	Elongation factor 2
C4YR46	Elongation factor 3
B9W7K4	Heat shock protein, putative
C4YQR0	Threonyl-tRNA synthetase
C4YG27	Putative uncharacterized protein
G8BL73	Putative uncharacterized protein
C4YMF9	Putative uncharacterized protein

5. Táblázat: NCR247 lehetséges kölcsönható partnerei citoszolikus fehérjepreparátumból készített LC-MS/MS analízis alapján.

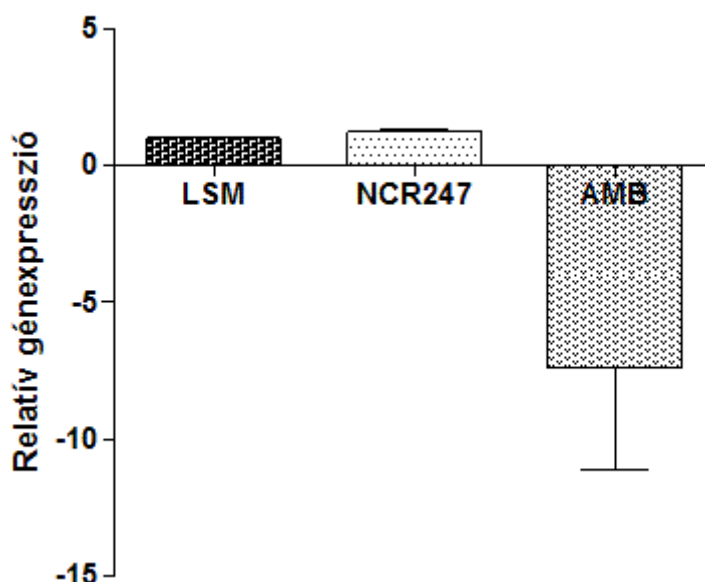
A riboszóma komponensek feltűnően nagy száma alapján valószínűsíthető, hogy a riboszóma egyben lejött az oszlopról és hogy sok, indirekt (a riboszómával kölcsönható) partnert is azonosítottunk.

Az eddigiek során az affinitás kromatográfiás kísérletekben citoszolikus fehérjepreparátummal dolgoztunk. A továbbiakban igyekeztünk megvizsgálni a lehetőségét direkt sejtmembrán fehérjével kialakított kölcsönhatásnak. Ezért megismételtük a pull-down kísérletet plazma membrán preparátummal is. Ebben az esetben is nagyszámú fragmentet kaptunk (6. Táblázat). Tömegspektrometriás analízisre a Strep peptiddel kezelt és StrepNCR247 peptiddel kezelt minták elúciós frakciói mellett a kezeletlen fehérjemintából is küldtünk, amit a kezeltékhez hasonlóan felvittünk az affinitás oszlopra, mostuk, majd eluáltuk. Ezzel próbáltuk kiszűrni az oszlophoz nem specifikusan kötődő fehérje molekulákat.

Acc #	Fehérje név
P0CC07	40S ribosomal protein S1
Q59N00	Likely cytosolic ribosomal protein S3
Q5AMI6	40S ribosomal protein S6
Q59T44	40S ribosomal protein S8
C4YJX2	40S ribosomal protein S9-B
Q5ADQ6	40S ribosomal protein S12
Q96W53	40S ribosomal protein S14
O94017	40S ribosomal protein S16
C4YTG2	40S ribosomal protein S18
Q5A7K0	40S ribosomal protein S24
C4YCU4	60S ribosomal protein L2
Q9P834	60S ribosomal protein L6
Q59WJ0	Likely cytosolic ribosomal protein L8
Q5AIB8	Likely cytosolic ribosomal protein L10
Q9UVJ4	60S ribosomal protein L10a
Q59Z66	Likely cytosolic ribosomal protein L11
Q5AJF7	Likely cytosolic ribosomal protein L12
Q5A6R1	Ribosomal protein L15
Q5ANC2	60S ribosomal protein L18
C4YQK4	Ribosomal protein L19
Q5AML4	60S ribosomal protein L20
C4YJX1	60S ribosomal protein L21-A
Q9P843	60S ribosomal protein L27
C4YGY4	60S ribosomal protein L30
P47834	60S ribosomal protein L36
A8K9C4	Elongation factor 1-alpha
Q5A0M4	Elongation factor 2
C4YR46	Elongation factor 3
P87206	ATP-dependent RNA helicase eIF4A
Q59VP1	Histone H2B.2
Q59VN4	Histone H4
Q5A7P7	Likely mitochondrial ATP synthase subunit Atp5
Q5A516	Potential mitochondrial inner membrane ATP/ADP translocator
P46273	Phosphoglycerate kinase
P87222	Heat shock protein SSB1
P46614	Pyruvate kinase
P43067	Alcohol dehydrogenase 1
P83779	Pyruvate decarboxylase
O93827	Mannose-1-phosphate guanyltransferase
P30575	Enolase 1
Q59VF6	Possible sphingolipid long chain base sensory protein
Q59KV8	Possible sphingolipid long chain base sensory protein
C4YJY0	Sphingolipid long chain base-responsive protein PIL1
P14235	Actin
C4YG27	Putative uncharacterized protein

6. Táblázat: NCR247 lehetséges kölcsönható partnerei membrán fehérjepreparátumból készített LC-MS/MS analízis alapján.

Ezzel a megközelítési móddal is számos citoplazmatikus illetve a transzlációban szerepet játszó fehérjét sikerült azonosítani, azonban megjelentek mitokondriális illetve membránhoz kötött fehérjék is. Az ily módon azonosított fehérjék között találtunk olyat, ami irodalmi adatok alapján potenciális kölcsönható partnere lehet egy antimikrobiális peptidnek, jelen esetben az NCR247-nek. Ez a fehérje a PIL1, ami az egyik fő alkotója az élesztő plazmamembránban található eizoszómáknak, melyek meghatározzák, hogy hol történik endocitózis. Ismertek olyan antifungális szerek, melyek a PIL1-et kódoló gén expresszióját biofilm állapotban szignifikánsan csökkentik. Ilyenek például az amfotericin B, vagy a ciklikus lipopeptidok, mint például az echinocandinok családjába tartozó caspofungin (Watanoto, Samaranayake mtsai. 2011). Ahhoz hogy megvizsgáljuk, hogy az NCR247 hatására történik-e az előzőekben leírtakhoz hasonló génexpressziós változás, kvantitatív, valós idejű PCR-t végeztünk, és az ehhez felhasznált cDNS-eket olyan RNS mintákról írtuk, melyeket biofilm kultúrában kezelt *C. albicans* sejtekből izoláltunk. A pozitív kontrollként alkalmazott amfotericin B-vel ellentétben, mely a vártan megfelelően génexpresszió csökkenést eredményezett, az NCR-es kezelés a kezletlen mintában megfigyelhető, a biofilm állapotra jellemző *PIL1* expressziót mutatta (17. ábra).



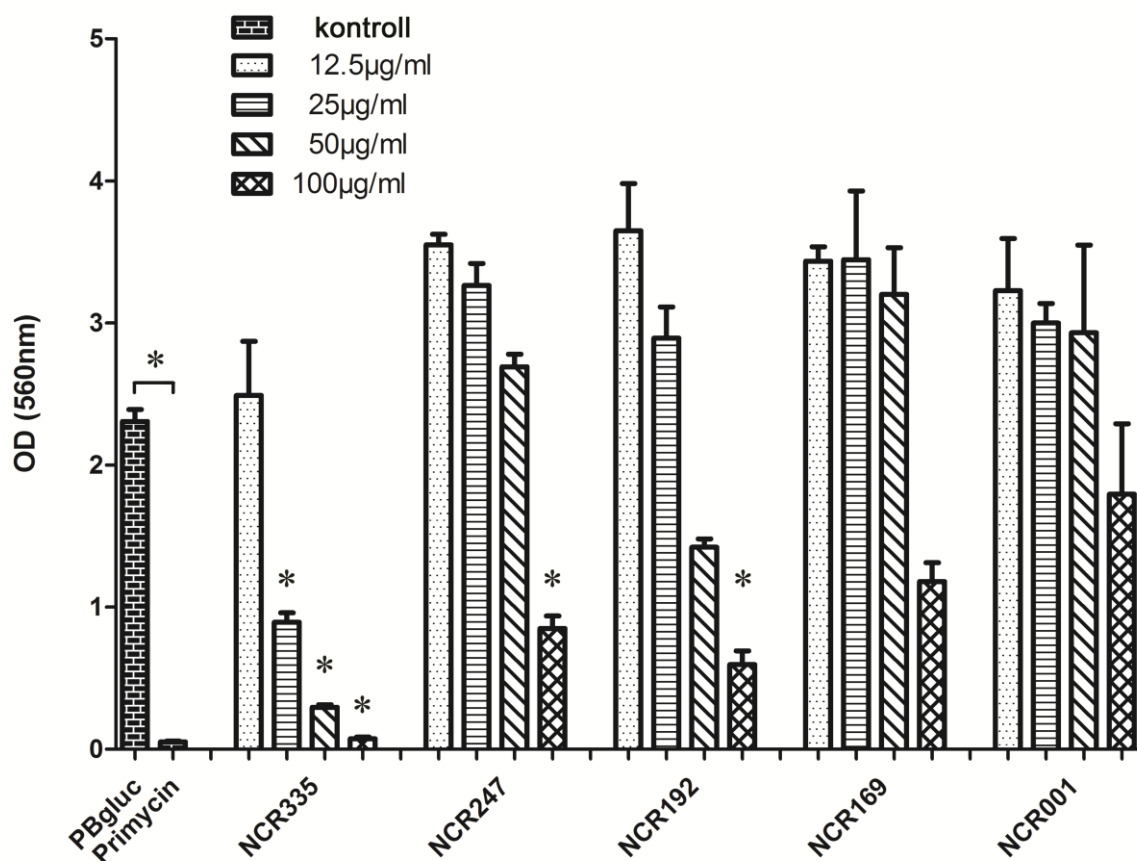
17. ábra: *PIL1* gén expressziója *C.albicans* WO-1 sejtekben biofilm állapotban. **LSM:** kezletlen kontrol; **NCR247:** 10 µg/ml koncentrációjú NCR247 peptiddel kezelt minta; **AMB:** 1,88 µg/ml koncentrációjú Amphotericin B-vel kezelt minta.

4.3 NCR-ek citotoxicitásának vizsgálata humán epitel sejteken

Ahhoz hogy egy antimikrobiális ágens a felhasználhatóság szempontjából sikeres jelöltté váljon az egészségügy számára, meg kell bizonyosodni afelől, hogy nem rendelkezik toxikus aktivitással humán sejtekkel szemben. Két életképességi teszt segítségével vizsgáltuk, hogy van-e ilyen citotoxikus hatása az NCR peptideknek. Ezeket a kísérleteket vaginális epitel sejtek és keratinociták bevonásával végeztük el, melyek a *Candida* fertőzések tipikus célpontjai.

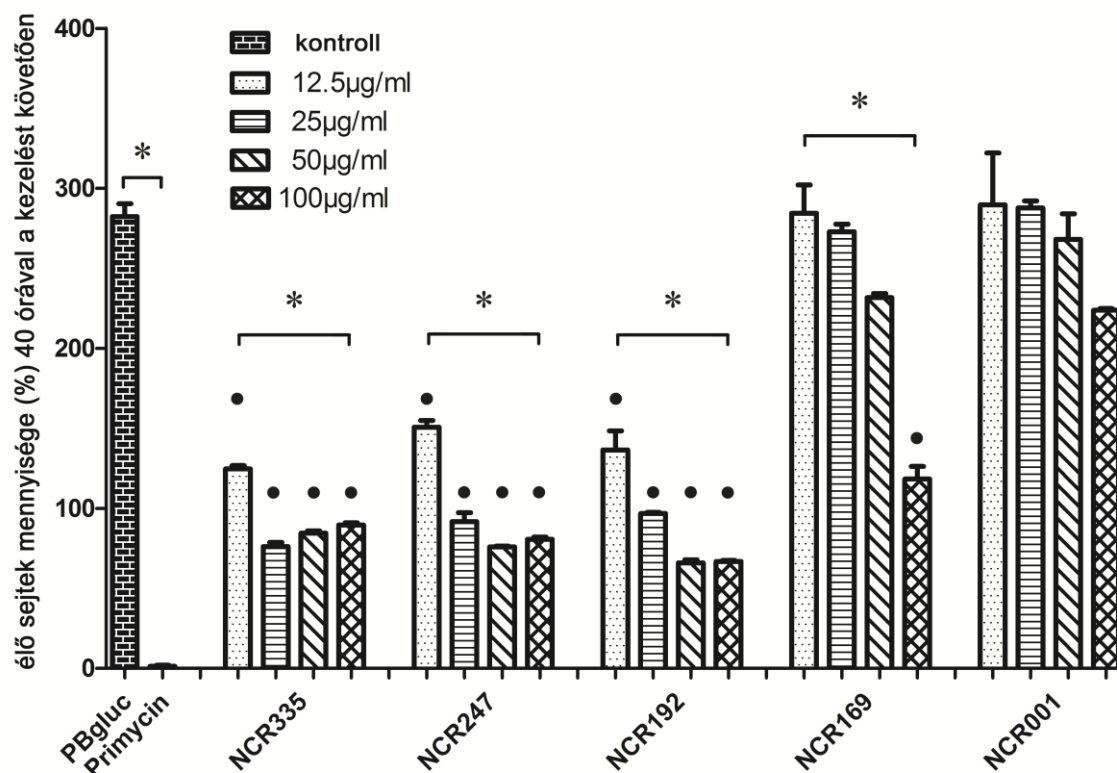
Az egyik ilyen életképességi teszt az MTT próba, melynek során a mitokondriális dehidrogenázok működése révén egy tetrazólium festékből, a 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromidból (MTT) képződő formazán abszorbanciájának mérése történik. A kapott értékek a sejtek metabolikus aktivitásáról (annak mértékéről) adnak információt. Az RTCA (Real-Time Cell Analysis) valós idejű sejtanalízist tesz lehetővé, mennyiségi információval szolgál a letapadt, élő sejtek számáról a váltakozó áramú ellenállás (impedancia) mérése alapján.

A citotoxicitás vizsgálatához találnunk kellett egy olyan közeget, amelyben a humán sejtek túlélnek, és a peptidjeink is megőrzik aktivitásukat. Sajnos minden, általunk tesztelt humán médiumban, még a szérumentesekben is inaktívnak bizonyultak az NCR-ek, feltehetően az ezekre a médiumokra jellemző magas sókoncentrációk miatt. Ugyanakkor az LSM médiumban, melyben a gombaérzékenységi vizsgálatokat végeztük, a humán sejtek gyors pusztulása volt megfigyelhető. Ezért egy foszfát puffert készítettünk, ami 5% glükózzal kiegészítve olyan izotóniás közeget biztosított a humán sejtek számára, melyben életben maradtak, míg az NCR-ek megőrizték benne antifungális aktivitásukat. Egy bőrfertőzések (illetve égett bőr) kezelésére alkalmas makrolid lakton antibiotikumot (Papp, Menesi mtsai. 1990), a primycint használtuk kontrollként, amely 10 µg/ml koncentrációban alkalmazva 90%-os hatékonysággal pusztította az epitel sejteket (18., 19. Ábra). Ezzel szemben a kationos NCR peptidek csak magas koncentrációk mellett okoztak sejtelhalást (pl.: NCR335: >25 µg/ml; NCR247 és NCR192: 100 µg/ml).



18. ábra: PK E6/E7 vaginális epitél sejtek metabolikus aktivitása NCR peptid kezeléseket követően. A kezelés hatására képződő formazán mennyiségét mértük. PBgluc: kezeletlen kontroll; Primycin: citotoxicitási pozitív kontroll.

Fontos megjegyezni, hogy az a koncentráció tartomány, ahol a kationos NCR-ek hatékonyan ölik a *C.albicans* (<25 µg/ml), nem, vagy csak alig befolyásolják a humán sejtek életképességét (19. ábra), azonban a túlélő vaginális epitél sejtek osztódása a peptid koncentrációtól függően leállt, vagy osztódási ciklusa lelassult (20. ábra).



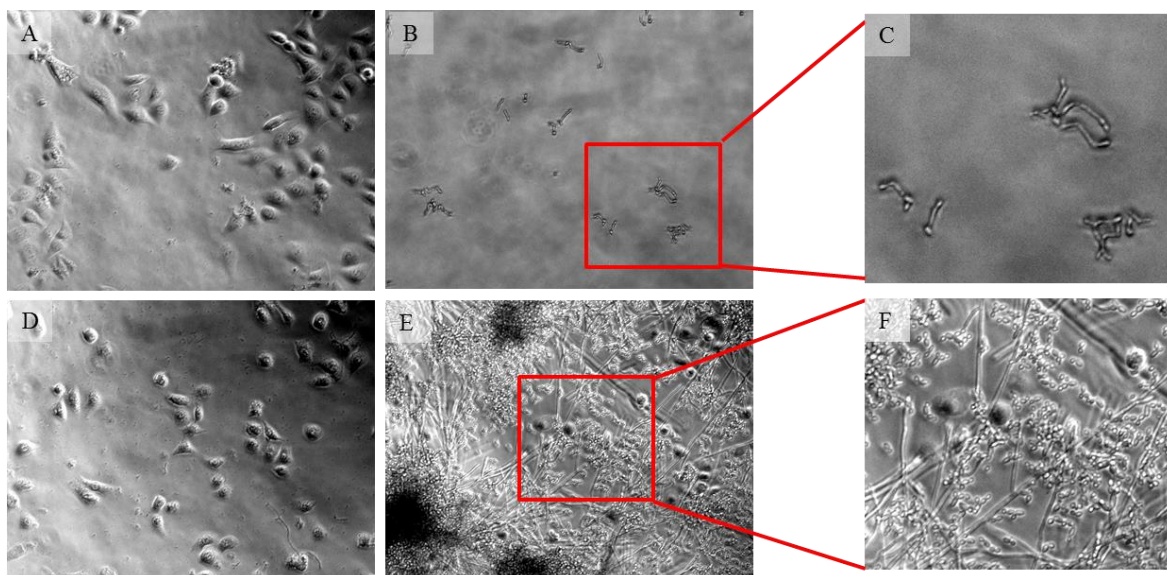
19. ábra: PK E6/E7 vaginális epitél sejtek osztódási képessége NCR peptid kezeléseket követően. Az élő, kitapadt sejtek relatív mennyiségét RTCA-val mértük 40 órával a peptidkezelés után. 100%-nak a kitapadt sejtek mennyiségét vettük közvetlenül a peptidkezelés után, amikor eltávolítottuk a peptideket és a sejtek visszakapták a CKM közeget.

Az erősen kationos peptidekkel ellentétben, a kevésbé kationos NCR169 és az anionos NCR001 peptideknek nem volt hatása sem az életképességére, sem pedig az osztódási képességére a humán sejteknek.

4.4 A kationos NCR peptidek megakadályozzák a humán vaginális epitél sejtek *C.albicans* okozta elhalását *in vitro*

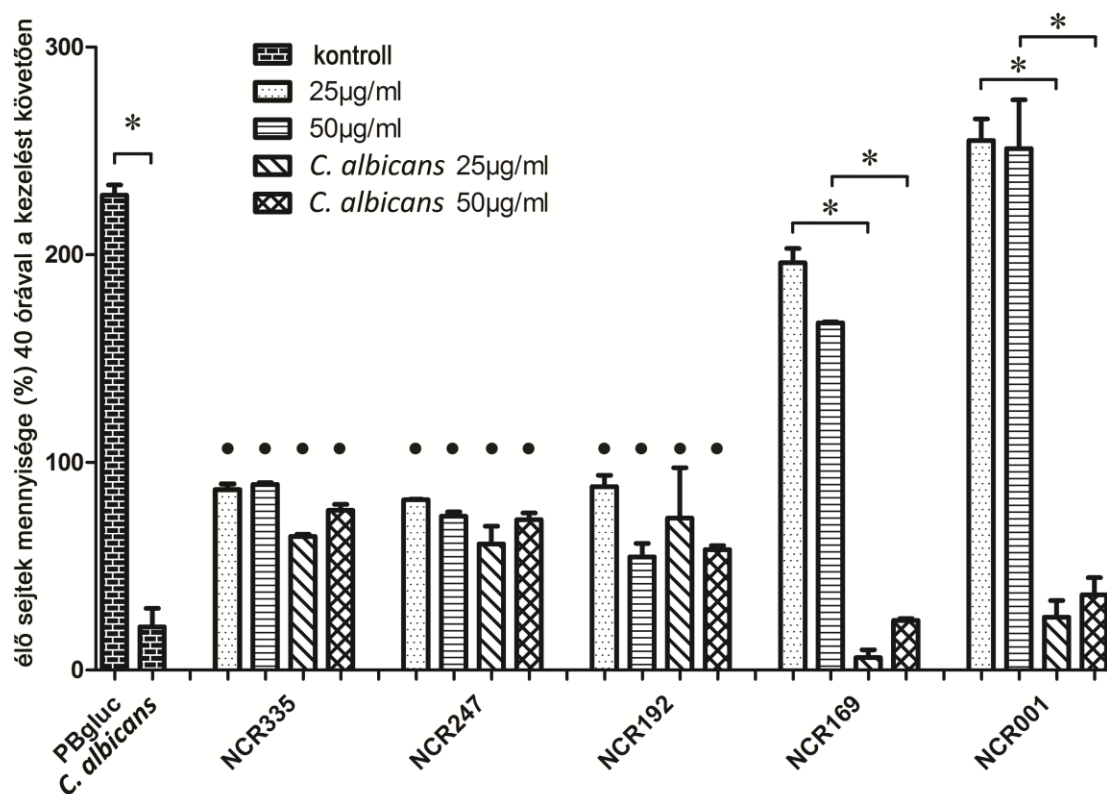
Több eltérő kísérleti rendszerrel sikerült kimutatni, hogy a kationos NCR peptidek alacsony koncentrációkban alkalmazva hatékonyan ölik a *C. albicans*-t, ugyanakkor nincsenek hatással a vaginális epitél sejtek életképességére. A *C. albicans* egyik jellemző tulajdonsága, hogy hozzátapad az epitél sejtek felszínéhez és invazív fonalas formájuk a sejtekbe hatolva azok pusztulását okozza (Ray ésPayne 1988, Gow, van de Veerdonk

mtsai, 2012). Egy *in vitro* ko-kultúra modellben megvizsgáltuk, hogy az NCR peptidek képesek-e megakadályozni az ötszörös mennyiségű gombasejttel (MOI=5) okozott vaginális epitelsejt pusztulást.

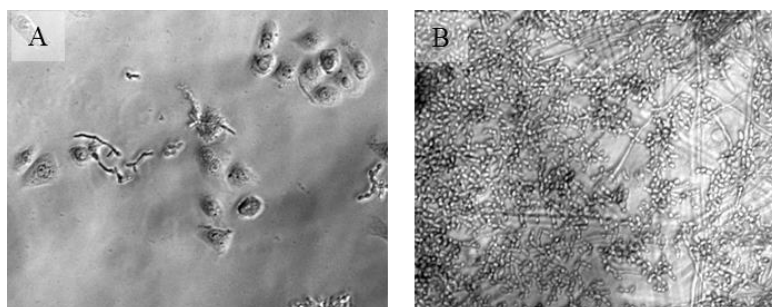


20. ábra: egy kationos peptid hatása PK E6/E7 vaginális epitél sejtekre, *C.albicans* hifákra. **A:** kezeletlen PK sejtek; **B, C:** 50 µg/ml NCR247 peptiddel kezelt *C. albicans* hifák; **D:** 50 µg/ml NCR247 peptiddel kezelt epitél sejtek; **E, F:** *C. albicans*-szal fertőzött PK sejtek. A képek 24 órával a 3 órás kezelést követően készültek.

Mivel a hifa forma képes behatolni az epitél sejtbe, ezért biztosítottunk 3 órát arra (8. Ábra: fertőzés fázisa), hogy a *C. albicans* sejtek az NCR kezelést megelőzően filamentumokat növesztve körbefonják az epitél sejteket (20. Ábra). Ez idő alatt a gomba hifázása megkezdődött, de a candida indukálta epitelsejt pusztulás még nem volt megfigyelhető (8. Ábra). Ezt követően a ko-kultúrákat 3 órán keresztül különböző koncentrációjú peptidekkel kezeltük (8. Ábra: kezelés), majd a regenerálódás fázisa alatt nyomon követtük a humán sejtek számának változását. 40 órával a peptid kezelést követően a hatás egyértelművé vált: a kationos peptidek, mint az NCR335, NCR247 és az NCR192 mind 50 mind pedig 25 µg/ml koncentrációban képesek voltak gátolni a candida fertőzés által kiváltott epitelsejt pusztulást. Ezzel szemben, a kevésbé kationos NCR169 és az anionos NCR001 peptidek gombaölő aktivitásuk hiányában nem tudták megakadályozni a vaginális epitél sejtek pusztulását (21. és 22. ábra).



21. ábra: NCR peptidek hatása PK E6/E7 vaginális epitelsejtek és *C. albicans* kevert kultúrájára. A 20. ábrához hasonlóan itt is az élő, kitapadt sejtek relatív mennyiségét mértük RTCA-val, 40 órával a kezelést követően. A 25 és 50 µg/ml jelölés a humán sejtek csak NCR peptiddel történő kezelésére vonatkozik, míg a *C. albicans* 25 µg/ml és a *C. albicans* 50 µg/ml azt mutatja, amikor a kevert kultúrát kezeltük a peptidekkel. *: szignifikáns eltérés az összekötött párok közt. •: a megfigyelt sejtszám szignifikánsan eltért a kezeletlen (PBgluc) és a fertőzött (*C. albicans*) kontrollokhoz képest. ($p < 0.0001$)



22. ábra: NCR peptidek hatása *C. albicans*-szal fertőzött PK E6/E7 vaginális epitelsejtekre. **A:** 50 µg/ml NCR335 peptiddel kezelt, **B:** 50 µg/ml NCR001 peptiddel kezelt kevert kultúra. A képek 3 óras kezelést követően 24 órával készültek.

5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Jelen tanulmány igazolja, hogy a pillangós viragú növények gümőspecifikus ciszteinben gazdag peptidjei között vannak, amelyek széles antimikrobiális hatásspektrummal rendelkeznek. A kationos NCR peptidek *in vitro* nemcsak baktericid hatással bírnak szimbiotikus partnereikkel, a rhizobiumokkal illetve más Gram-negatív, valamint Gram-pozitív (patogén) baktériumokkal szemben (Van de Velde, Zehirov mtsai. 2010), (Tiricz, Szucs mtsai. 2013), hanem antifungális tulajdonságuk is van, amit ez a munka ismertet. Ezek a defenzin-szerű molekulák hatékonynak bizonyultak számos élesztőszerűen növvő illetve fonalas (opportunist) patogén gomba ellen, köztük minden általunk tesztelt *Candida* fajjal szemben, beleértve az egyik leggyakoribb opportunist human patogént, a *C. albicans*-t is. A peptidek 6,25 – 25 µg/ml koncentráció tartományban gátolták az élesztőszerűen növvő gombák sarjadzását, a fonalas gombák spóráinak csírázását valamint más, rövid kationos antimikrobiális peptidhez hasonlóan, mint amilyen például a Sub5 (Mania, Hilpert mtsai. 2010), a hifafonalak továbbnövekedését is gátolták. Azonban nem csak növekedés gátlást tapasztaltunk ebben a tartományban, hanem a részletesebben vizsgált *C. albicans* esetében fungicid hatást is. Annak az oka, hogy egyes peptideknél alacsonyabb MFC-t tapasztaltunk az MIC-hoz képest, az lehet, hogy a MIC értékeket 96 lyukú mikrotiter lemezben határoztuk meg, ahol a sejtek könnyen kitapadnak a lyukak felszínére és bár biofilmet képezni nincs idejük az azonnali peptidkezelés miatt, de talán ez a kitapadt állapot elég ahhoz, hogy ellenállóbbak legyenek az antifungális szerekkel szemben (Watanoto, Samaranayake mtsai. 2011). Ezzel ellentétben az MFC meghatározáshoz eppendorf csőben kezeltük a sejteket, amiben nem tudnak úgy kitapadni, mint a mikrotiter lemezben, és ez a planktonikus forma bizonyítottan érzékenyebben reagál az antimikrobiális kezelésekre (Watanoto, Samaranayake mtsai. 2011). Általánosan elmondható, hogy az általunk megvizsgált peptidek közül a 9-nél magasabb izoelektromos ponttal rendelkező NCR peptideknek volt gátló aktivitása. Egyes fajok ellenállónak bizonyultak néhány 9-nél magasabb izoelektromos ponttal rendelkező kationos peptiddel szemben is, így az NCR035 (IP=) esetében nem tapasztaltunk gátló hatást *C. albicans*-on és *Tr. mentagrophytes*-en, míg az NCR055 és az NCR035 hatástalannak bizonyult *Rh. stoloniferrel* szemben, illetve az utóbbinak csak enyhe aktivitása volt *A. nigerre*. A megvizsgált gombák közül a legellenállóbb az *A. flavus* volt, amire négy, 9-nél magasabb izoelektromos pontú peptidnek egyáltalán nem volt gátló hatása, háromnak pedig csak

minimális. Bár a természetben jó néhány anionos AMP fordul elő (Harris, Dennison mtsai. 2009), az alacsony izoelektromos pontú NCR-ek nem mutattak antifungális aktivitást.

Jól ismert tény, hogy számos defenzin a célsejt membránjának permeabilizálásával fejti ki antimikrobiális aktivitását baktériumokkal és gombákkal szemben egyaránt (Ganz 2003). A fluoreszcensen jelölt kationos NCR247 akkumulálódása a negatív töltésű *Candida* sejtmembránban szintén ezt a tényt támasztja alá, így ez tűnik az NCR-ek elsődleges célpontjának. Ugyanakkor a legújabb tanulmányok emellett sejten belüli célpontokat is megjelölnek a kationos peptidek esetén, úgy mint DNS/RNS és/vagy fehérje szintézis, vagy enzimaktivitások gátlása (Hilpert, McLeod mtsai. 2010). Így a gyenge, intracellulárisan megfigyelhető fluoreszcens jel alapján nem zárhatóak ki citoszolikus célpontok az NCR peptideknél sem. Az affinitás kromatográfiás kísérletekkel az NCR247 peptid több ilyen lehetséges kölcsönható partnerére is rábukkantunk, azonban egy másik módszerrel, élesztő kettős-hibrid vizsgálatokkal nem tudtuk a kiválasztott fehérjékkel esetlegesen létrejövő kölcsönhatásokat megerősíteni. Ennek magyarázata lehet a kétféle kísérleti felállás, mert a lehúzásos kísérletekben mind a direkt, mind az indirekt (azaz ugyanazon fehérjekomplexbe tartozó, de a kérdéses fehérjével nem közvetlenül kapcsolódó) kölcsönható partnereket azonosítjuk, míg az élesztő kettős-hibrid módszerrel csak a direkt interakciók kimutathatóak. Emellett az eredményeket befolyásolhatja a csaliként használt peptid konformációja is. A lehúzásokra használt szintetikus peptid prepatátumban a peptidekben levő ciszteinek létrehozhatnak mind intra-, mind intermolekuláris diszulfid hidakat, míg a sejtmag környezetében ilyen hidak kialakulása kevésbé valószínű. Emellett a rövid peptid hozzákapcsolása a jóval nagyobb élesztő fehérjéhez szintén módosíthatja a konformációt, s vele a potenciális kölcsönhatások erősségét. Mindazonáltal, a gombasejtekből azonosított potenciális kölcsönható fehérjék listája nagyon hasonló a *Sinorhizobium meliloti* baktériumsejtekből hasonló módon azonosított proteinek listájához (Farkas, Maroti mtsai. 2014). A szimbiotikus baktériumokból is a transzlációban résztvevő fehérjéket, az ATP-szintáz és piruvát-dehidrogenáz alegységeket, valamint chaperonin fehérjéket lehetett azonosítani.

A kationos NCR peptidek jelentős morfológiai változásokat okoztak a gomba hifákon, melyek már két óra kezelést követően megnyilvánultak a sejtmembrán szerkezetének drámai rongálódásában. Ezt a fajta membránkárosító hatást igazolta a calcein felszabadulása is az NCR peptidekkel kezelt candida sejtekből, a humán β -defenzin 2, és -3-hoz, vagy a hisztatin 5-höz hasonlóan (Vylkova, Nayyar mtsai. 2007). A legtöbb

állati eredetű kationos antimikrobiális peptid a plazmamembrán foszfolipidjeivel kötött elektrosztatikus kölcsönhatáson keresztül indukál membrán permeabilizálódást (Brogden 2005). Számos növényi defenzin ugyanezt a hatást gyakran a (gomba) sejtek felszínén található nagy affinitású kötődési helyekkel kialakított specifikus kölcsönhatásokon keresztül éri el (Thevissen, Osborn mtsai. 2000). Erre példa, az RsAFP2 nevű retek defenzin, ami a gombamembrán egy specifikus lipidjével, a glükoszilceramiddal (GlcCer) lép kölcsönhatásba, ezzel megállítja a gomba növekedését és a sejt halálát eredményezi (Thevissen, Warnecke mtsai. 2004), (Tavares, Thevissen mtsai. 2008). Valószínűleg az NCR peptideknek nem a GlcCer a célpontja, ugyanis az NCR-ek fungicid aktivitását tapasztaltuk *Candida glabrata*-val szemben is, amely faj nem képes a GlcCer szintézisére.

A baktérium, gomba és emlős sejtmembrán kémiai összetétele nagymértékben különbözhet egymástól, a fő komponensei azonban mindegyiknek a foszfolipidek, melyeknek a hidrofil feji végén egy negatív töltésű foszfát csoport található. Ez utóbbi képezi a célpontját számos membránkárosító kationos peptidnek. Mint terápiás szer, fontos hogy az adott AMP a terápiában részesülőkre ne legyen toxikus hatással. Ebből a célból megvizsgáltuk néhány kiválasztott NCR peptid citotoxicitását immortalizált humán sejtvonalakon. A kontrollként használt makrolid antibiotikum komplexszel ellentétben még a legerősebb kationos peptid sem mutatott citotoxicitást azokban a koncentrációkban, melyek hatékonyak voltak a baktériumokkal és a gombákkal szemben. Ez azt sejteti, hogy az emlősök membránját – feltehetően eltérő összetétele miatt – nem tudják a peptidek annyira károsítani, mint a vizsgált mikroorganizmusokét. Bár terápiás koncentrációban nem befolyásolták a humán sejtek életképességét, de a kationos NCR peptidek gátolták az immortalizált humán sejtek osztódását. Azt azonban további kísérletekkel még tisztázni kell, hogy a DNS szintézis és a sejtosztódás is, vagy csak a citokinézis gátlódott az emlős sejtekben. Baktériumsejtekben a szubletális koncentrációjú kationos NCR peptidekkel történő kezelés úgy gátolja a sejtosztódást, hogy normálisan folyó DNS-replikáció mellett a citokinézis gátlódik, s ezáltal megnövekedik a sejt DNS tartalma (Van de Velde, Zehirov mtsai. 2010), (Farkas, Maroti mtsai. 2014), (Penterman, Abo mtsai. 2014). Emellett hátra van még a peptidek humán sejten belüli pontos lokalizációjának és celluláris célpontjainak meghatározása is. Ezek az eredmények új irányokat és távlatokat nyithatnak az NCR peptidekkel illetve alkalmazásukkal kapcsolatos kutatásokban. Ha sikerül megfejteni a sejtosztódás gátlásának molekuláris hátterét, valamint megoldani, hogy az aktív kationos peptidek célzottan például a rákos sejtekhez szállítódjanak és ott megtartsák aktivitásukat

míg ki nem fejtik hatásukat, akkor akár tumorok növekedésének megállítására is szolgálhatnak.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Mivel a kationos NCR peptidek egyaránt rendelkeznek baktericid és fungicid aktivitással, így széles-spektrumú AMP-knek tekinthetők. A primycin antibiotikum komplexszel ellentétben az NCR peptidek az MFC/MIC koncentráció értékeknél csak jóval magasabb koncentrációkban voltak toxikusak az epítél sejtekre nézve. Azoknál a koncentráció értékeknél, melyek hatékonyak bizonyultak mind a gombákkal, mind pedig a baktériumokkal szemben (Van de Velde, Tiricz, jelen munka), a humán sejtek életben maradtak, bár sejtosztódásuk korlátozódott. Ezen sajátágaik a NCR-eket érdemes jelöltekké minősítik mikrobiális fertőzések elleni terápiában. Alkalmazhatóságukkal kapcsolatosan fontos megemlíteni, hogy más antimikrobiális peptidekhez hasonlóan, a sók és a szérum (egyes) alkotóelemei gátolják aktivitásukat.

Mindezek ismeretében, az NCR-ek illetve azok származékai elsősorban topikális/bőrfelszíni fertőzések kezelésére alkalmas új antimikrobiális szerek lehetnek a jövőben. Szisztémás felhasználásukat só és szérum érzékenységük ugyan limitálhatja, de speciális hordozók segítségével megoldható lehet a fertőzött szövetekbe történő eljuttatásuk.

7. ÖSSZEFOGLALÓ

A napjainkban használatos antibiotikumok hosszan tartó alkalmazásával megjelentek az úgynevezett multidrog rezisztens mikroorganizmusok, melyekkel szemben a védekezés egyre nehezebb, és időben egyre elnyúltabb terápiákat igényel. Ezen organizmusok fokozottan növekvő száma komoly gondot okoz az egészségügynek.

Az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia nem csak a baktériumok körében fordul elő. Egyre több tanulmány számol be olyan patogén gomba izolátumokról, melyek ellen az általánosan használatos antifungális szerek hatástalannak bizonyulnak. Mindamellett, a hosszantartó terápia nem kívánt mellékhatásokat is okozhat, mint például az egyik leghatékonyabb antifungális szer, az amfotericin B által okozott súlyos vese- és májkárosodás. Gombás fertőzéseket nem csak obligát patogének okozhatnak. Az úgynevezett opportunistá patogének, mint amilyen a *Candida albicans*, vagy a *Malassezia furfur* is, a normál humán mikroflóra tagjai, azonban immunszuppresszált vagy immundeficiens egyéneknél súlyos betegségek kórokozói lehetnek. Az antimikrobiális peptidek, mint újgenerációs antibiotikumok, hatékony megoldást nyújthatnak ezen problémák megoldására.

Az antimikrobiális peptideket a természetben a baktériumoktól kezdve minden rendszertani kategóriába tartozó élőlény termel, állatokban és növényekben a veleszületett immunitás hatékony fegyverei. Vannak közöttük baktérium, gomba és vírus ellenes aktivitásúak, valamint olyanok, melyek antibakteriális és antifungális hatással egyaránt bírnak. Széles hatás spektrummal és gyors ölő, vagy gátló aktivitással rendelkeznek, ennél fogva a kórokozókkal szembeni küzdelem fegyvertárában ígéretes jelöltnek tekinthetők.

Növényi antimikrobiális peptideket már izoláltak a növény minden részéből, így a gyökérből, a szárból, levélből, virágból és magból is. A nemrégiben azonosított gümőspecifikus ciszteinben gazdag peptideket (nodule-specific cysteine rich peptides), röviden NCR-eket a pillangós virágúak egy speciális csoportjába, a kloroplasztisz genom egyik fordított ismétlődését elvesztő kládba (IRLC, azaz Inverted Repeat Lacking Clade; ide tartozik például a lucerna, a borsó, a lóbab, a fehérhere) tartozó növények a gyökerükön fejlődő szimbiotikus szerv, a nitrogénkötő gümő sejtjeiben termelik. Itt elsődleges szerepük a szimbiotikus partner (rhizobiumok) terminális differenciációjának irányítása. Az NCR-ek rövid peptidek, 30-50 aminosavból állnak és 4-6 ciszteint tartalmaznak konzervált pozícióban, ami alapján az antimikrobiális peptidek egy

csoportjához, a defenzinekhez hasonlíthatóak. Az IRLC-ba tartozó *Medicago truncatula*-ban eddig közel 500 NCR-t kódoló gént azonosítottak. Az érett peptidek elsődleges szekvenciája gyenge homológiát mutat és jelentős eltérések figyelhetők meg mind izoelektromos pontjukban, expressziós mintázatukban, mind pedig aktivitásukban. Csoportunk korábban kimutatta, hogy egyes, magas izoelektromos ponttal rendelkező NCR peptidek antimikrobiális hatással rendelkeznek számos Gram-negatív és Gram-pozitív baktériummal szemben. Munkánk során azt tapasztaltuk, hogy ezek az NCR peptidek nagyfokú aktivitást mutatnak mind élesztőszerűen növekvő (*Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. crusei*, *C. glabrata*, *Malassezia furfur*), mind pedig fonalas gombákkal (*Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus flavus*, *Asp. niger*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium graminearum*) szemben is.

Annak kiderítésére, hogy a vizsgált kationos NCR peptidek milyen mechanizmussal fejtik ki hatásukat élesztőszerűen növekvő gombákon, mely sejtalkotók illetve fehérjék a célpontjaik, az egyik leggyakoribb opportunistá humán patogén gombát, a *Candida albicans*-t választottuk. Az antimikrobiális peptidek egyik gyakori célpontja a sejtmembrán integritásának megszüntetése. Fluoreszcensen jelölt NCR peptideket alkalmazva megállapítottuk, hogy elsősorban a sejtmembránban lokalizálódnak, a membrán permeabilizáció vizsgálatára használt calcein felszabadulása pedig a membrán integritásának megváltozását igazolta. Membránkárosító hatásukat pszeudohifás alakon is tapasztaltuk. Mindezek mellett nem zárhatók ki sejten belüli célpontok sem.

Affinitás kromatográfia segítségével nagyszámú feltételes kölcsönható partnert kaptunk az egyik kationos peptid esetében. Ezek többsége riboszóma fehérje, illetve más, transzlációban szerepet játszó faktor volt. Néhány kölcsönhatást és célpontot ezek közül élesztő kéthibrid rendszerben valamint valós idejű PCR reakcióban próbáltunk validálni, ám ezekkel a módszerekkel nem találtunk tényleges kölcsönhatást az NCR peptid és a gomba fehérjei közt.

A terápiás alkalmazhatóság érdekében életképességi tesztekkel vizsgáltuk az NCR-ek esetleges citotoxicitási aktivitását humán vaginális epitél sejteken. Az élő sejtek metabolikus aktivitását mérő MTT teszt alapján az antifungális koncentráció tartományban (<25 µg/ml) a kationos peptidek nem, vagy csak enyhén befolyásolták a humán sejtek életképességét. Ugyanakkor, az élő sejtek számának valós idejű monitorozása során, melyet a Roche ellenállás-mérésen alapuló xCelligence rendszerével végeztünk, kiderült, hogy a peptid kezelés gátolja osztódásukat.

Az aktív kationos NCR peptidek nemcsak az élesztő formát voltak képesek gátolni, de *in vitro* kevert kultúrában megakadályozták a fonalas forma növekedését is és ezáltal azok humán epitel sejtekre kifejtett ölü hatását. Tapasztalataink alapján, a só és a szérum jelenléte gátolja antifungális aktivitásukat. Ezen eredmények alapján, az NCR peptidek, ha az alkalmazáshoz olyan megfelelő közegben formulázzák őket, amelyben képesek megőrizni aktivitásukat a humán epitel felszínén, alkalmasak lehetnek felszíni kandidiázisok kezelésére.

8. SUMMARY

The wide-spread and prolonged usage of conventional antibiotics caused the appearance of so-called multidrug resistant microorganisms. The defense against them is becoming harder and demands even more prolonged therapy. The increasing number of these microbes is becoming a serious problem for public health.

Antibiotic resistance concerns not just bacteria but fungi, too. More and more study reports about pathogen isolates which are resistant against conventional antifungal agents. Moreover, the sustained therapy causes undesirable side effects such as serious kidney and liver damage in case of amphotericin B, one of the most powerful antifungal agent.

Fungal infections could be caused by both obligate and opportunistic pathogens. The latter ones, such as *Candida albicans* or *Malassezia furfur* are members of the normal human microflora, however, they could be the causative agents of serious diseases in immunocompromised patients. As new generational antibiotics, antimicrobial peptides (AMPs) might provide effective solutions for these problems.

AMPs represent ancient host defense effector molecules present in all organisms across the evolutionary spectrum. AMPs produced by the animal and plant innate immune system have a broad-spectrum and rapid killing activities against a wide range of microorganisms including fungi.

Plants have evolved extreme richness of AMPs that could be detected in all plant organs including roots, seeds, flowers, stems and leaves. In certain members of the Inverted Repeat Lacking Clade (IRLC) of legumes (such as alfalfa, pea, lentil), the large family of nodule-specific cystein-rich (NCR) peptides is produced in the infected cells of the symbiotic organ called nodule. Their primary function in symbiosis is to govern the differentiation of endosymbiotic bacteria. NCR peptides contain a relatively conserved secretory signal peptide and a highly diverse mature peptide composed of 30-50 amino acids with conserved positions of four or six cysteines that make them similar to a group of AMPs, the defensins. So far, more than 500 NCR peptide coding gene has been identified in the genome of *Medicago truncatula* that are differentially expressed in distinct developmental zones of the nodule. Due to the high sequence diversity, the isoelectric point (pI) of the peptides ranges from 3.2 to 11.2 and there are high differences in their activity, too. Our group has shown earlier, that some cationic NCR peptides have bactericid effect on various Gram-negative and Gram-positive bacteria. In the frame of the

presented work, we found that these peptides have killing activity both against yeast like (*Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. crusei*, *C. glabrata*, *Malassezia furfur*) and filamentous fungi (*Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus flavus*, *Asp. niger*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium graminearum*).

We chose one of the most common opportunistic human pathogenic fungi, *Candida albicans* to investigate the mechanism of the activity of cationic NCR peptides on yeast-like growing fungi and to study which cell organelles or proteins could be their targets. The disturbance of cell membrane integrity is a frequent mode of action in the case of antimicrobial peptides. We determined that NCR peptides predominantly localized to the fungal plasma membrane by using fluorescently labeled peptides. Furthermore, calcein release indicating membrane permeabilization proved that they caused changes in membrane integrity. We found membrane damaging effect on pseudohyphae, as well. In addition, intracellular targets cannot be excluded either.

Using a cationic peptide in affinity chromatography we identified numerous putative interacting partner in *C. albicans*. Most of them were ribosomal proteins and other polypeptides that are also implicated in translation. We tried to validate some of the results with yeast-two hybrid system or qRT-PCR, however, the interactions between the NCR peptides and the fungal proteins could not be confirmed yet.

As a therapeutic agent should not be toxic to the patients, the cytotoxicity of selected NCR peptides on an immortalized human cell line was investigated with viability assays. According to MTT assay, which provides information about the metabolic state of living cells, cationic peptides in the antifungal concentration range (<25 µg/ml) affected only slightly the viability of the human cells. On the other hand, when the cell proliferation ability was measured with the real-time cell analyser (RTCA), the surviving cells showed a highly reduced cell proliferation at 12.5 µg/ml concentration and at higher concentrations they could not maintain their proliferation ability.

The active cationic NCR peptides could eliminate not only the yeast form of the fungi but they were able to prevent the growth and the subsequent human cell killing activity of the hyphal form in an *in vitro* co-culture model. Based on our experiences salts and components of the serum inhibit the activity of NCR peptides similarly to other AMPs. These results indicate that in proper formulation that helps to maintain the activity of the peptides on the human epithelial surface, the cationic NCR peptides might be effective drugs for the treatment of candidiasis.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Akins, R. A. (2005). "An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*." *Med Mycol* 43(4): 285-318.
2. Alunni, B., Z. Kevei, M. Redondo-Nieto, A. Kondorosi, P. Mergaert and E. Kondorosi (2007). "Genomic organization and evolutionary insights on GRP and NCR genes, two large nodule-specific gene families in *Medicago truncatula*." *Mol Plant Microbe Interact* 20(9): 1138-1148.
3. Andrade, A. C., G. Del Sorbo, J. G. Van Nistelrooy and M. A. Waard (2000). "The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds." *Microbiology* 146 (Pt 8): 1987-1997.
4. Baixench, M. T., N. Aoun, M. Desnos-Ollivier, D. Garcia-Hermoso, S. Bretagne, S. Ramires, C. Piketty and E. Dannaoui (2007). "Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review." *J Antimicrob Chemother* 59(6): 1076-1083.
5. Bjorstad, A., G. Askarieh, K. L. Brown, K. Christenson, H. Forsman, K. Onnheim, H. N. Li, S. Teneberg, O. Maier, D. Hoekstra, C. Dahlgren, D. J. Davidson and J. Bylund (2009). "The host defense peptide LL-37 selectively permeabilizes apoptotic leukocytes." *Antimicrob Agents Chemother* 53(3): 1027-1038.
6. Boman, H. G. (1995). "Peptide antibiotics and their role in innate immunity." *Annu Rev Immunol* 13: 61-92.
7. Boman, H. G., B. Agerberth and A. Boman (1993). "Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine." *Infect Immun* 61(7): 2978-2984.
8. Bommineni, Y. R., H. Dai, Y. X. Gong, J. L. Soulages, S. C. Fernando, U. Desilva, O. Prakash and G. Zhang (2007). "Fowlicidin-3 is an alpha-helical cationic host defense peptide with potent antibacterial and lipopolysaccharide-neutralizing activities." *FEBS J* 274(2): 418-428.
9. Boucher, H. W., A. H. Groll, C. C. Chiou and T. J. Walsh (2004). "Newer systemic antifungal agents." *Drugs* 64(18): 1997-2020.
10. Boucher, H. W., G. H. Talbot, J. S. Bradley, J. E. Edwards, D. Gilbert, L. B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg and J. Bartlett (2009). "Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America." *Clinical Infectious Diseases* 48(1): 1-12.
11. Bradshaw, J. P. (2003). "Cationic antimicrobial peptides." *BioDrugs* 17(4): 233-240.
12. Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" *Nat Rev Microbiol* 3(3): 238-250.

13. Brogden, K. A., M. R. Ackermann, P. B. McCray, Jr. and K. M. Huttner (1999). "Differences in the concentrations of small, anionic, antimicrobial peptides in bronchoalveolar lavage fluid and in respiratory epithelia of patients with and without cystic fibrosis." *Infect Immun* 67(8): 4256-4259.
14. Cannon, R. D., E. Lamping, A. R. Holmes, K. Niimi, K. Tanabe, M. Niimi and B. C. Monk (2007). "Candida albicans drug resistance another way to cope with stress." *Microbiology* 153(Pt 10): 3211-3217.
15. Casteels, P., C. Ampe, F. Jacobs and P. Tempst (1993). "Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*)." *J Biol Chem* 268(10): 7044-7054.
16. Chayakulkeeree, M., M. A. Ghannoum and J. R. Perfect (2006). "Zygomycosis: the re-emerging fungal infection." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25(4): 215-229.
17. Chryssanthou, E. and J. Sjolín (2004). "Post-antifungal effect of amphotericin B and voriconazole against *Aspergillus fumigatus* analysed by an automated method based on fungal CO₂ production: dependence on exposure time and drug concentration." *J Antimicrob Chemother* 54(5): 940-943.
18. Cornely, O. A. (2008). "Aspergillus to Zygomycetes: causes, risk factors, prevention, and treatment of invasive fungal infections." *Infection* 36(4): 296-313.
19. Denning, D. W. (2003). "Echinocandin antifungal drugs." *Lancet* 362(9390): 1142-1151.
20. Deray, G. (2002). "Amphotericin B nephrotoxicity." *J Antimicrob Chemother* 49 Suppl 1: 37-41.
21. Deslouches, B., K. Islam, J. K. Craig, S. M. Paranjape, R. C. Montelaro and T. A. Mietzner (2005). "Activity of the de novo engineered antimicrobial peptide WLBU2 against *Pseudomonas aeruginosa* in human serum and whole blood: implications for systemic applications." *Antimicrob Agents Chemother* 49(8): 3208-3216.
22. Ellis, D. (2002). "Amphotericin B: spectrum and resistance." *J Antimicrob Chemother* 49 Suppl 1: 7-10.
23. Esser, K., P. A. Lemke, D. McLaughlin and E. McLaughlin (2001). *The mycota*, Springer.
24. Evans, J., D. Levesque, A. De Lahunta and H. Jensen (2004). "Intracranial fusariosis: a novel cause of fungal meningoencephalitis in a dog." *Veterinary Pathology Online* 41(5): 510-514.
25. Farkas, A., G. Maroti, H. Durgo, Z. Gyorgypal, R. M. Lima, K. F. Medzihradszky, A. Kereszt, P. Mergaert and E. Kondorosi (2014). "Medicago truncatula symbiotic peptide NCR247 contributes to bacteroid differentiation through multiple mechanisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(14): 5183-5188.

26. Gallagher, J. C. and K. B. Lee (2004). "Program to restrict use of i.v. fluconazole." *Am J Health Syst Pharm* 61(16): 1695-1698.
27. Ganz, T. (2003). "Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity." *Nat Rev Immunol* 3(9): 710-720.
28. Gennaro, R. and M. Zanetti (2000). "Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides." *Biopolymers* 55(1): 31-49.
29. Gergely L (2003). "Orvosi mikrobiológia." Alliter Kiadói és Oktatásfejlesztő Alapítvány második, átdolgozott kiadás
30. Giuliani, A., G. Pirri and S. F. Nicoletto (2007). "Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics." *Central European Journal of Biology* 2(1): 1-33.
31. Gonzalez, C. E., M. G. Rinaldi and A. M. Sugar (2002). "Zygomycosis." *Infect Dis Clin North Am* 16(4): 895-914, vi.
32. Gow, N. A., F. L. van de Veerdonk, A. J. Brown and M. G. Netea (2012). "Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization." *Nat Rev Microbiol* 10(2): 112-122.
33. Groisman, E. A. (1994). "How bacteria resist killing by host-defense peptides." *Trends Microbiol* 2(11): 444-449.
34. Gueho, E., G. Midgley and J. Guillot (1996). "The genus *Malassezia* with description of four new species." *Antonie Van Leeuwenhoek* 69(4): 337-355.
35. Gyemant, N., M. Tanaka, S. Antus, J. Hohmann, O. Csuka, L. Mandoky and J. Molnar (2005). "In vitro search for synergy between flavonoids and epirubicin on multidrug-resistant cancer cells." *In Vivo* 19(2): 367-374.
36. Gyorgyey, J., D. Vaubert, J. I. Jimenez-Zurdo, C. Charon, L. Troussard, A. Kondorosi and E. Kondorosi (2000). "Analysis of *Medicago truncatula* nodule expressed sequence tags." *Mol Plant Microbe Interact* 13(1): 62-71.
37. Gyurko, C., U. Lendenmann, R. F. Troxler and F. G. Oppenheim (2000). "Candida albicans mutants deficient in respiration are resistant to the small cationic salivary antimicrobial peptide histatin 5." *Antimicrob Agents Chemother* 44(2): 348-354.
38. Haag, A. F., M. Baloban, M. Sani, B. Kersch, O. Pierre, A. Farkas, R. Longhi, E. Boncompagni, D. Herouart, S. Dall'angelo, E. Kondorosi, M. Zanda, P. Mergaert and G. P. Ferguson (2011). "Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis." *PLoS Biol* 9(10): e1001169.
39. Harris, F., S. R. Dennison and D. A. Phoenix (2009). "Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms." *Curr Protein Pept Sci* 10(6): 585-606.
40. Hilpert, K., B. McLeod, J. Yu, M. R. Elliott, M. Rautenbach, S. Ruden, J. Burck, C. Muhle-Goll, A. S. Ulrich, S. Keller and R. E. Hancock (2010). "Short cationic

- antimicrobial peptides interact with ATP." *Antimicrob Agents Chemother* 54(10): 4480-4483.
41. Hirsch, A. M. (1992). "Developmental biology of legume nodulation." *New Phytologist* 122(2): 211-237.
42. Horvath, I., M. Kramer, P. I. Bauer and K. G. Buki (1979). "The mode of action of primycin." *Arch Microbiol* 121(2): 135-139.
43. Hsiao, Y.-C., K.-W. Tsan and T.-Y. Wang (2002). "Rhinocerebral mucormycosis in diabetes: A case report." *J Intern Med Taiwan* 13: 160-164.
44. Huang, H. W. (2000). "Action of antimicrobial peptides: two-state model." *Biochemistry* 39(29): 8347-8352.
45. Karunakaran, R., A. F. Haag, A. K. East, V. K. Ramachandran, J. Prell, E. K. James, M. Scocchi, G. P. Ferguson and P. S. Poole (2010). "BacA is essential for bacteroid development in nodules of galeoid, but not phaseoloid, legumes." *J Bacteriol* 192(11): 2920-2928.
46. Kereszt, A., P. Mergaert, G. Maroti and E. Kondorosi (2011). "Innate immunity effectors and virulence factors in symbiosis." *Curr Opin Microbiol* 14(1): 76-81.
47. Kesavan, S., K. T. Holland and E. Ingham (2000). "The effects of lipid extraction on the immunomodulatory activity of *Malassezia* species in vitro." *Med Mycol* 38(3): 239-247.
48. Kevei, Z., J. M. Vinardell, G. B. Kiss, A. Kondorosi and E. Kondorosi (2002). "Glycine-rich proteins encoded by a nodule-specific gene family are implicated in different stages of symbiotic nodule development in *Medicago* spp." *Mol Plant Microbe Interact* 15(9): 922-931.
49. Knogge, W. (1996). "Fungal Infection of Plants." *Plant Cell* 8(10): 1711-1722.
50. Kondorosi, E. and A. Kondorosi (2004). "Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development." *FEBS Lett* 567(1): 152-157.
51. Kumamoto, C. A. and M. D. Vences (2005). "Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence." *Cell Microbiol* 7(11): 1546-1554.
52. Lai, R., Y.-T. Zheng, J.-H. Shen, G.-J. Liu, H. Liu, W.-H. Lee, S.-Z. Tang and Y. Zhang (2002). "Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima*." *Peptides* 23(3): 427-435.
53. Lo, H. J., J. R. Kohler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti and G. R. Fink (1997). "Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent." *Cell* 90(5): 939-949.
54. Mader, J. S. and D. W. Hoskin (2006). "Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment."

-
55. Maertens, J., I. Raad, G. Petrikos, M. Boogaerts, D. Selleslag, F. B. Petersen, C. A. Sable, N. A. Kartsonis, A. Ngai, A. Taylor, T. F. Patterson, D. W. Denning, T. J. Walsh and G. Caspofungin Salvage Aspergillosis Study (2004). "Efficacy and safety of caspofungin for treatment of invasive aspergillosis in patients refractory to or intolerant of conventional antifungal therapy." *Clin Infect Dis* 39(11): 1563-1571.
56. Mahfouz, T. and E. Anaissie (2003). "Prevention of fungal infections in the immunocompromised host." *Curr Opin Investig Drugs* 4(8): 974-990.
57. Maisetta, G., M. Di Luca, S. Esin, W. Florio, F. L. Brancatisano, D. Bottai, M. Campa and G. Batoni (2008). "Evaluation of the inhibitory effects of human serum components on bactericidal activity of human beta defensin 3." *Peptides* 29(1): 1-6.
58. Mania, D., K. Hilpert, S. Ruden, R. Fischer and N. Takeshita (2010). "Screening for antifungal peptides and their modes of action in *Aspergillus nidulans*." *Appl Environ Microbiol* 76(21): 7102-7108.
59. Maroti, G., A. Kereszt, E. Kondorosi and P. Mergaert (2011). "Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals." *Res Microbiol* 162(4): 363-374.
60. Marr, K. A., T. Patterson and D. Denning (2002). "Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy." *Infect Dis Clin North Am* 16(4): 875-894, vi.
61. Martinez, J. L. and F. Baquero (2002). "Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance." *Clin Microbiol Rev* 15(4): 647-679.
62. Maunoury, N., M. Redondo-Nieto, M. Bourcy, W. Van de Velde, B. Alunni, P. Laporte, P. Durand, N. Agier, L. Marisa, D. Vaubert, H. Delacroix, G. Duc, P. Ratet, L. Aggerbeck, E. Kondorosi and P. Mergaert (2010). "Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches." *PLoS One* 5(3): e9519.
63. Mergaert, P., K. Nikovics, Z. Kelemen, N. Maunoury, D. Vaubert, A. Kondorosi and E. Kondorosi (2003). "A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs." *Plant Physiol* 132(1): 161-173.
64. Mergaert, P., T. Uchiumi, B. Alunni, G. Evanno, A. Cheron, O. Catrice, A. E. Mausset, F. Barloy-Hubler, F. Galibert, A. Kondorosi and E. Kondorosi (2006). "Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium-legume* symbiosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(13): 5230-5235.
65. Mookherjee, N. and R. E. Hancock (2007). "Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections." *Cell Mol Life Sci* 64(7-8): 922-933.
66. Mora-Duarte, J., R. Betts, C. Rotstein, A. L. Colombo, L. Thompson-Moya, J. Smietana, R. Lupinacci, C. Sable, N. Kartsonis, J. Perfect and G. Caspofungin
-

- Invasive Candidiasis Study (2002). "Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis." *N Engl J Med* 347(25): 2020-2029.
67. Nelson, P. E., M. C. Dignani and E. J. Anaissie (1994). "Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species." *Clin Microbiol Rev* 7(4): 479-504.
68. Neofytos, D., L. R. Lombardi, R. K. Shields, D. Ostrander, L. Warren, M. H. Nguyen, C. B. Thompson and K. A. Marr (2012). "Administration of voriconazole in patients with renal dysfunction." *Clin Infect Dis* 54(7): 913-921.
69. Nucci, M. and E. Anaissie (2002). "Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management." *Clin Infect Dis* 35(8): 909-920.
70. Nucci, M. and E. Anaissie (2007). "Fusarium infections in immunocompromised patients." *Clin Microbiol Rev* 20(4): 695-704.
71. Odom, R. B. (1993). "Future trends in dermatology." *Dermatol Clin* 11(2): 307-310.
72. Ogawa, H., R. Summerbell, K. Clemons, T. Koga, Y. Ran, A. Rashid, P. Sohnle, D. Stevens and R. Tsuboi (1997). "Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses." *Medical mycology* 36: 166-173.
73. Oono, R. and R. F. Denison (2010). "Comparing symbiotic efficiency between swollen versus nonswollen rhizobial bacteroids." *Plant Physiol* 154(3): 1541-1548.
74. Papp, T., L. Menesi and I. Szalai (1990). "Experiences in the Ebrimycin gel treatment of burns." *Ther Hung* 38(3): 125-128.
75. Pappas, P. G., J. H. Rex, J. D. Sobel, S. G. Filler, W. E. Dismukes, T. J. Walsh, J. E. Edwards and A. Infectious Diseases Society of (2004). "Guidelines for treatment of candidiasis." *Clin Infect Dis* 38(2): 161-189.
76. Parniske, M. (2008). "Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses." *Nat Rev Microbiol* 6(10): 763-775.
77. Penterman, J., R. P. Abo, N. J. De Nisco, M. F. Arnold, R. Longhi, M. Zanda and G. C. Walker (2014). "Host plant peptides elicit a transcriptional response to control the *Sinorhizobium meliloti* cell cycle during symbiosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(9): 3561-3566.
78. Perea, S., J. L. Lopez-Ribot, W. R. Kirkpatrick, R. K. McAtee, R. A. Santillan, M. Martinez, D. Calabrese, D. Sanglard and T. F. Patterson (2001). "Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients." *Antimicrob Agents Chemother* 45(10): 2676-2684.
79. Peschel, A., M. Otto, R. W. Jack, H. Kalbacher, G. Jung and F. Gotz (1999). "Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to

- defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides." *J Biol Chem* 274(13): 8405-8410.
80. Peschel, A. and H. G. Sahl (2006). "The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance." *Nat Rev Microbiol* 4(7): 529-536.
81. Peters, B. M., M. E. Shirtliff and M. A. Jabra-Rizk (2010). "Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs?" *PLoS pathogens* 6(10): e1001067.
82. Pfaller, M. A. and D. J. Diekema (2007). "Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem." *Clin Microbiol Rev* 20(1): 133-163.
83. Pivarcsi, A., I. Nagy, A. Koreck, K. Kis, A. Kenderessy-Szabo, M. Szell, A. Dobozy and L. Kemeny (2005). "Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells." *Microbes Infect* 7(9-10): 1117-1127.
84. Rajan, N., D. L. Pruden, H. Kaznari, Q. Cao, B. E. Anderson, J. L. Duncan and A. J. Schaeffer (2000). "Characterization of an immortalized human vaginal epithelial cell line." *J Urol* 163(2): 616-622.
85. Ray, T. L. and C. D. Payne (1988). "Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase." *Infect Immun* 56(8): 1942-1949.
86. Ribes, J. A., C. L. Vanover-Sams and D. J. Baker (2000). "Zygomycetes in human disease." *Clin Microbiol Rev* 13(2): 236-301.
87. Rice, L. B. (2003). "Controlling antibiotic resistance in the ICU: different bacteria, different strategies." *Cleve Clin J Med* 70(9): 793-800.
88. Richard, J. P., K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik and B. Lebleu (2003). "Cell-penetrating peptides A reevaluation of the mechanism of cellular uptake." *Journal of Biological Chemistry* 278(1): 585-590.
89. Roden, M. M., T. E. Zaoutis, W. L. Buchanan, T. A. Knudsen, T. A. Sarkisova, R. L. Schaufele, M. Sein, T. Sein, C. C. Chiou and J. H. Chu (2005). "Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases." *Clinical Infectious Diseases* 41(5): 634-653.
90. Sabatelli, F., R. Patel, P. A. Mann, C. A. Mendrick, C. C. Norris, R. Hare, D. Loebenberg, T. A. Black and P. M. McNicholas (2006). "In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts." *Antimicrob Agents Chemother* 50(6): 2009-2015.
91. Sanglard, D. and F. C. Odds (2002). "Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences." *Lancet Infect Dis* 2(2): 73-85.

92. Schitteck, B., R. Hipfel, B. Sauer, J. Bauer, H. Kalbacher, S. Stevanovic, M. Schirle, K. Schroeder, N. Blin, F. Meier, G. Rassner and C. Garbe (2001). "Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands." *Nat Immunol* 2(12): 1133-1137.
93. Shai, Y. (2002). "From innate immunity to de-novo designed antimicrobial peptides." *Curr Pharm Des* 8(9): 715-725.
94. Spelbrink, R. G., N. Dilmac, A. Allen, T. J. Smith, D. M. Shah and G. H. Hockerman (2004). "Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins." *Plant Physiol* 135(4): 2055-2067.
95. Steinstraesser, L., T. Koehler, F. Jacobsen, A. Daigeler, O. Goertz, S. Langer, M. Kesting, H. Steinau, E. Eriksson and T. Hirsch (2008). "Host defense peptides in wound healing." *Mol Med* 14(7-8): 528-537.
96. Stumpe, S. and E. P. Bakker (1997). "Requirement of a large K⁺-uptake capacity and of extracytoplasmic protease activity for protamine resistance of *Escherichia coli*." *Arch Microbiol* 167(2/3): 126-136.
97. Tavares, P. M., K. Thevissen, B. P. Cammue, I. E. Francois, E. Barreto-Bergter, C. P. Taborda, A. F. Marques, M. L. Rodrigues and L. Nimrichter (2008). "In vitro activity of the antifungal plant defensin RsAFP2 against *Candida* isolates and its in vivo efficacy in prophylactic murine models of candidiasis." *Antimicrob Agents Chemother* 52(12): 4522-4525.
98. Tenover, F. C. (2006). "Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria." *Am J Infect Control* 34(5 Suppl 1): S3-10; discussion S64-73.
99. Thevissen, K., R. W. Osborn, D. P. Acland and W. F. Broekaert (2000). "Specific binding sites for an antifungal plant defensin from *Dahlia* (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity." *Mol Plant Microbe Interact* 13(1): 54-61.
100. Thevissen, K., D. C. Warnecke, I. E. Francois, M. Leipelt, E. Heinz, C. Ott, U. Zahringer, B. P. Thomma, K. K. Ferket and B. P. Cammue (2004). "Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides." *J Biol Chem* 279(6): 3900-3905.
101. Thomma, B. P., B. P. Cammue and K. Thevissen (2002). "Plant defensins." *Planta* 216(2): 193-202.
102. Tiricz, H., A. Szucs, A. Farkas, B. Pap, R. M. Lima, G. Maroti, E. Kondorosi and A. Kereszt (2013). "Antimicrobial Nodule-Specific Cysteine-Rich Peptides Induce Membrane Depolarization-Associated Changes in the Transcriptome of *Sinorhizobium meliloti*." *Appl Environ Microbiol* 79(21): 6737-6746.
103. Van de Velde, W., G. Zehirov, A. Szatmari, M. Debreczeny, H. Ishihara, Z. Kevei, A. Farkas, K. Mikulass, A. Nagy, H. Tiricz, B. Satiat-Jeunemaitre, B. Alunni, M. Bourge, K. Kucho, M. Abe, A. Kereszt, G. Maroti, T. Uchiumi, E.

- Kondorosi and P. Mergaert (2010). "Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis." *Science* 327(5969): 1122-1126.
104. Villanueva, A., E. Gotuzzo, E. G. Arathoon, L. M. Noriega, N. A. Kartsonis, R. J. Lupinacci, J. M. Smietana, M. J. DiNubile and C. A. Sable (2002). "A randomized double-blind study of caspofungin versus fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis." *Am J Med* 113(4): 294-299.
105. Vylkova, S., N. Nayyar, W. Li and M. Edgerton (2007). "Human beta-defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption." *Antimicrob Agents Chemother* 51(1): 154-161.
106. Wadia, J. S. and S. F. Dowdy (2005). "Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer." *Adv Drug Deliv Rev* 57(4): 579-596.
107. Watamoto, T., L. P. Samaranayake, H. Egusa, H. Yatani and C. J. Seneviratne (2011). "Transcriptional regulation of drug-resistance genes in *Candida albicans* biofilms in response to antifungals." *J Med Microbiol* 60(Pt 9): 1241-1247.
108. Weitzman, I. and R. C. Summerbell (1995). "The dermatophytes." *Clin Microbiol Rev* 8(2): 240-259.
109. Wickern, G. M. (1993). "Fusarium allergic fungal sinusitis." *J Allergy Clin Immunol* 92(4): 624-625.
110. Wingard, J. R., M. H. White, E. Anaissie, J. Raffalli, J. Goodman, A. Arrieta and L. A. A. C. S. Group (2000). "A randomized, double-blind comparative trial evaluating the safety of liposomal amphotericin B versus amphotericin B lipid complex in the empirical treatment of febrile neutropenia. L Amph/ABLC Collaborative Study Group." *Clin Infect Dis* 31(5): 1155-1163.
111. Yeaman, M. R. and N. Y. Yount (2003). "Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance." *Pharmacol Rev* 55(1): 27-55.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Kereszt Attilának a lehetőséget, hogy kutatócsoportjában elsajátíthattam a mikrobiológiai és molekuláris biológiai technikákat és ismereteket! Hálás vagyok az irántam tanúsított bizalmáért és tanácsaiért, melyekkel önálló kutatómunkára ösztönzött! Köszönöm az áldozatos munkáját, mindenre kitejedő nélkülözhetetlen segítségét és türelmét!

Köszönöm Prof. Dr. Kondorosi Évának, hogy lehetővé tette számomra a kutatótevékenységében való részvételt és észrevételeivel segítette munkámat!

Hálásan köszönöm Dr Nagy Istvánnak a biztatást és a sok segítséget, amivel támogatta munkámat!

Köszönet illeti Vörös Andreát a kísérletekben nyújtott fáradhatatlan segítségéért!

Köszönöm Vincze Kontár Katalinnak önzetlen segítségét, hogy kezem helyett kezem volt!

Köszönöm Dr Ábrahám Editnek és Farkas Attilának a fehérje munkákban nyújtott segítségét!

Köszönöm Radvánszkyné Mikuláss Katának az élesztő kettős hibrid rendszerrel kapcsolatos hasznos tanácsait!

Köszönöm Dr Hunyadkürti Juditnak és Dr Boboescu Iuliannak a dolgozatírás során nyújtott technikai segítséget és a lelki támogatást!

Köszönöm munkatársaimnak hogy mindig barátsággal fordultak hozzám!

Köszönöm a segítségét a volt Baygen intézet valamennyi dolgozójának!

Végtelen hálával tartozom családomnak az odaadó támogatásukért és végtelen türelmükért, különösen kislányomnak, aki engedte, hogy ez a dolgozat elkészüljön!